

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re U.S. Patent Application of)
WAKABAYASHI *et al.*)
Application Number: To Be Assigned)
Filed: Concurrently Herewith)
For: A METHOD OF ANALYSIS OF DNA SEQUENCE)

J1046 U.S. PTO
10/038717
01/08/02

Honorable Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231

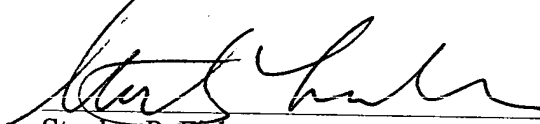
**REQUEST FOR PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. § 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of April 16, 2001, the filing date of the corresponding Japanese patent application 2001-117232.

The certified copy of corresponding Japanese patent application 2001-117232 is being submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copies is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,


Stanley P. Fisher
Registration Number 24,344

REED SMITH LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200
January 8, 2002

**PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT**

J1046 U.S. PTO
10/038717
01/08/02

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this office.

Date of Application : April 16, 2001
Application Number : Patent Application No. 117232 of 2001
Applicant (s) : Hitachi, Ltd.

Dated this 26th day of November, 2001

Kouzou OIKAWA
Commissioner,
Patent Office

Certificate No. 2001-3103580

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

J1046 U.S. PTO
10/038717
01/08/02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 4月16日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-117232

出 願 人

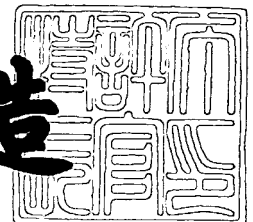
Applicant(s):

株式会社日立製作所

2001年11月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3103580

【書類名】 特許願

【整理番号】 NT01P0333

【提出日】 平成13年 4月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

 【氏名】 若林 由記

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所 中央研究所内

 【氏名】 神原 秀記

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所 中央研究所内

 【氏名】 周 国華

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所 中央研究所内

 【氏名】 釜堀 政男

【特許出願人】

 【識別番号】 000005108

 【氏名又は名称】 株式会社日立製作所

【代理人】

 【識別番号】 100068504

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 小川 勝男

 【電話番号】 03-3661-0071

【選任した代理人】

【識別番号】 100086656

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 恭助

【電話番号】 03-3661-0071

【選任した代理人】

【識別番号】 100094352

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐々木 孝

【電話番号】 03-3661-0071

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 081423

【納付金額】 21,000円

【その他】

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成12年度新エネルギー・産業技術総合開発機構（再）委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸塩基配列解析法および核酸塩基配列解析試薬キットおよび核酸塩基配列解析装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸に相補鎖結合した DNA プライマーの伸長反応に使用される試薬に含まれるピロリン酸をピロフォスファターゼにより分解する、または／および、前記試薬に含まれるアデノシン 5' - 三リン酸をアピラーゼにより分解する工程と

前記伸長反応を行なう工程と、

前記伸長反応により生成されるピロリン酸を検出する工程と、
を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記ピロフォスファターゼ、または／および、前記アピラーゼが担体に固定されていることを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 種類のデオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、または、少なくとも 1 種類の前記デオキシヌクレオチドの類似体を含む少なくとも 1 種類の前記デオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、ピロフォスファターゼを添加して、前記溶液のそれぞれに含まれるピロリン酸を分解する工程と、

DNA プライマー、DNA ポリメラーゼ、前記工程で得られた少なくとも 1 つの前記溶液を用いて、標的核酸に相補鎖結合した前記 DNA プライマーが伸長反応により伸長され、前記伸長反応により生じたピロリン酸が化学発光反応により検出される工程と、

を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 4】

少なくとも 1 種類のデオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれ

に、または、少なくとも1種類の前記デオキシヌクレオチドの類似体を含む少なくとも1種類の前記デオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、ピロフォスファターゼを添加して、前記溶液のそれぞれに含まれるピロリン酸を分解する工程と、

DNAプライマー、DNAポリメラーゼ、前記工程で得られた少なくとも1つの前記溶液を用いて、標的核酸に相補鎖結合した前記DNAプライマーが伸長反応により伸長され、前記伸長反応により生じたピロリン酸が、アデノシン5'-ホスホ硫酸およびATPスルフリラーゼの存在下で、アデノシン5'-三リン酸に変換され、前記アデノシン5'-三リン酸、発光酵素、発光基質を含む化学発光反応により生じた発光が検出される工程と、
を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項5】

請求項4に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記最初の工程の後に、前記溶液のそれぞれの中の前記ピロフォスファターゼを除去する、または、失活させる工程を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項6】

請求項4に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記最初の工程は、前記DNAプライマーを含む溶液、前記DNAポリメラーゼを含む溶液、前記発光酵素を含む溶液、前記発光基質を含む溶液、前記アデノシン5'-ホスホ硫酸を含む溶液、前記ATPスルフリラーゼを含む溶液の少なくとも1つに、前記ピロフォスファターゼを添加して、前記溶液の少なくとも1つに含まれる前記ピロリン酸を分解する工程、または／および、アピラーゼを添加して、前記溶液の少なくとも1つに含まれるアデノシン5'-三リン酸を分解する工程を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項7】

請求項6に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記ピロフォスファターゼまたは／およびアピラーゼが添加された前記溶液の中の前記ピロフォスファターゼまたは／およびアピラーゼを除去する、または、失活させる工程を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記ピロフォスファターゼまたは／およびアピラーゼが担体に固定されていることを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 9】

請求項 4 に記載の核酸塩基解析法に於いて、前記プライマーの 3' 末端の塩基が、標的核酸の 1 塩基多型部位の 3' 末端側の 1 つ手前の塩基に相補的であることを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 10】

請求項 4 に記載の核酸塩基解析法に於いて、前記 DNA プライマーの 3' 末端から 2 塩基目、または、3 塩基目の塩基が前記標的核酸の塩基配列と相補的でない塩基に置換されていることを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 11】

デオキシアデノシン 5' - α - チオール三リン酸もしくは、デオキシアデノシン 5' - α - チオールトリフォスフェイトを含む溶液、デオキシチミジン 5' - 三リン酸を含む溶液、デオキシグアノシン 5' - 三リン酸を含む溶液、デオキシシチジン 5' - 三リン酸を含む溶液のそれぞれに、ピロフォスファターゼを添加して、前記溶液のそれぞれに含まれるピロリン酸を分解する第 1 の工程と、

前記溶液のそれぞれの中の前記ピロフォスファターゼを除去する、または、失活させる第 2 の工程と、

DNA プライマー、DNA ポリメラーゼ、前記第 2 の工程で得られた少なくとも 1 つの前記溶液を用いて、標的核酸に相補鎖結合した前記 DNA プライマーが伸長反応により伸長され、前記伸長反応により生じたピロリン酸が、アデノシン - 5' - ホスホ硫酸および ATP スルフリラーゼの存在下で、アデノシン 5' - 三リン酸に変換され、前記アデノシン 5' - 三リン酸、ルシフェラーゼ、ルシフェリンを含む化学発光反応により生じた発光が検出される第 3 の工程と、を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 12】

デオキシアデノシン 5' - α - チオール三リン酸もしくは、デオキシアデノシン

5' - α -チオトリフォスフェイト、デオキシチミジン 5' - 三リン酸、デオキグアノシン 5' - 三リン酸、デオキシシチジン 5' - 三リン酸を含む溶液に、ピロフォスファターゼを添加して、前記溶液に含まれるピロリン酸を分解する第 1 の工程と、

前記溶液の中の前記ピロフォスファターゼを除去する、または、失活させる第 2 の工程と、

DNA プライマー、DNA ポリメラーゼ、前記第 2 の工程で得られた前記溶液を用いて、標的核酸に相補鎖結合した前記 DNA プライマーが伸長反応により伸長され、前記伸長反応により生じたピロリン酸が、アデノシン 5' - ホスホ硫酸および ATP スルフィラーゼの存在下で、アデノシン 5' - 三リン酸に変換され、前記アデノシン 5' - 三リン酸、ルシフェラーゼ、ルシフェリンを含む化学発光反応により生じた発光が検出される工程と、

を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の核酸塩基解析法に於いて、前記 DNA プライマーの 3' 末端から 2 塩基目、または、3 塩基目の塩基が前記標的核酸の塩基配列と相補的でない塩基に置換されていることを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記伸長反応による伸長鎖を 5' 末端から、5' \rightarrow 3' エクソヌクレアーゼ反応で分解し、前記 DNA プライマーを前記標的核酸に繰り返し相補鎖結合させて前記伸長反応を行なうことを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 15】

デオキシアデノシン 5' - 三リン酸、デオキシチミジン 5' - 三リン酸、デオキグアノシン 5' - 三リン酸、デオキシシチジン 5' - 三リン酸を含む溶液に、ピロフォスファターゼを添加して、前記溶液に含まれるピロリン酸を分解する第 1 の工程と、

前記溶液の中の前記ピロフォスファターゼを除去する、または、失活させる工程と、

DNAプライマー、DNAポリメラーゼおよび前記第2の工程で得られた前記溶液を用いて、標的核酸に相補鎖結合した前記DNAプライマーの伸長反応により生じたピロリン酸が化学発光反応により検出される工程と、
を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項16】

請求項15に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、デオキシアデノシン5'-三リン酸、デオキシチミジン5'-三リン酸、デオキグアノシン5'-三リン酸、デオキシシチジン5'-三リン酸の何れかの代りに類似体を使用することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項17】

請求項15に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記DNAプライマーの3'末端から2塩基目、または、3塩基目の塩基が前記標的核酸の特定の領域の塩基配列と相補的でない塩基に置換されていることを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項18】

請求項15に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記伸長反応による伸長鎖を5'末端から、5'→3'エキソヌクレアーゼ反応で分解し、前記DNAプライマーを前記標的核酸に繰り返し相補鎖結合させて前記伸長反応を行なうことを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項19】

デオキシアデノシン5'-三リン酸、デオキシチミジン5'-三リン酸、デオキグアノシン5'-三リン酸、デオキシシチジン5'-三リン酸を含む溶液に、ピロフォスファターゼを添加して、前記溶液に含まれるピロリン酸を分解する第1の工程と、

前記溶液の中の前記ピロフォスファターゼを除去する、または、失活させる第2の工程と、

相補鎖伸長能力を有し5塩基長から8塩基長の範囲の第1のオリゴマーと、標的核酸に相補鎖結合し相補鎖伸長能力のない第2のオリゴマーとを直列に前記標的核酸に相補鎖結合させ、DNAポリメラーゼ、前記第2の工程で得られた前記

溶液を用いて、前記第 1 のオリゴマーの伸長反応を行ない、前記伸長反応により生じるピロリン酸が化学発光反応により検出される工程と、
を有することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、デオキシアデノシン 5' - 三リン酸、デオキシチミジン 5' - 三リン酸、デオキグアノシン 5' - 三リン酸、デオキシシチジン 5' - 三リン酸の何れかの代りに類似体を使用することを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 9 に記載の核酸塩基配列解析方法に於いて、前記第 1 のオリゴマーの 3' 末端から 2 塩基目、または、3 塩基目の塩基が前記標的核酸の特定の領域の塩基配列と相補的でない塩基に置換されていることを特徴とする核酸塩基配列解析方法。

【請求項 2 2】

少なくとも 1 種類のデオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、または、少なくとも 1 種類の前記デオキシヌクレオチドの類似体を含む少なくとも 1 種類の前記デオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、ピロフォスファターゼを有することを特徴とする試薬キット。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の試薬キットに於いて、DNA ポリメラーゼを有することを特徴とする試薬キット。

【請求項 2 4】

デオキシアデノシン 5' - α - チオー三リン酸もしくは、デオキシアデノシン 5' - α - チオートリフォスフェイト、デオキシチミジン 5' - 三リン酸、デオキグアノシン 5' - 三リン酸、デオキシシチジン 5' - 三リン酸、ピロフォスファターゼを有することを特徴とする試薬キット。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の試薬キットに於いて、前記ピロフォスファターゼが担体に固定されていることを特徴とする試薬キット。

【請求項 2 6】

DNAポリメラーゼ、DNAプライマー、アデノシン-5'-ホスホ硫酸、ATPスルフリラーゼ、発光酵素、発光基質、アピラーゼの少なくとも1つ、および、ピロフォスファターゼを有することを特徴とする試薬キット。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の試薬キットに於いて、前記ピロフォスファターゼ、または／および、前記アピラーゼが担体に固定されていることを特徴とする試薬キット。

【請求項 2 8】

標的核酸とこれにハイブリダイズするDNAプライマーとを固体表面の異なる区画に保持する複数の前記区画を具備する反応チップと、前記複数の各区画に前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応を起こすための試薬を供給する手段と、前記ターゲットDNAにハイブリダイズした前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応で生成されるピロリン酸と前記試薬を利用して生じる化学発光を検出する光検出器とを有するとともに、前記試薬を供給する手段が前記試薬から夾雑のピロリン酸あるいはアデノシン5'-三リン酸を除去するための除去部を介して試薬を供給するものであることを特徴とする核酸塩基配列解析装置。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸塩基配列の解析方法、これに用いる試薬キットおよびこの解析方法を実施するための解析装置に関し、特に、DNAに相補鎖結合したプライマーの伸長鎖の形成時に生じるピロリン酸（P P i : Pyrophosphoric acid）を化学発光反応により検出することにより核酸塩基配列を解析する方法、これに用いる試薬キットおよびこの解析方法を実施するための解析装置に関する。より詳細には、DNA塩基配列の決定方法、1塩基変異（S N P s : Single Nucleotide Polymorphisms）の検出方法、1塩基変異の発現頻度の計測方法およびこの解析方法を実施するための解析装置に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

近年のゲノム解析の進展に伴い、DNA情報を医療等に幅広く利用しようとする動きが活発である。特に、ゲノムに存在する特定配列の有無の検査や特定の配列に存在するSNPsの検出が重要な課題となっている。ヒトゲノムに見られるSNPsは1000塩基に1つあると推定されているので、ヒトゲノムには300万個から1000万個のSNPsが存在すると考えられている。これらのSNPsは、各人の個性や医薬品に対する感受性等と関連しており、最近、SNPsの分析が注目を集めている。

【0003】

SNPsの分析では、分析1：SNPsを検出するための分析および塩基配列中に頻繁に発現する位置の分析、分析2：得られたSNPsデータベースの内で、医療分野で重要なSNPsデータがどれであるか調べるための分析、分析3：医療分野で重要なSNPsを用いて個人毎の診断や治療の指針を得るための分析、等がある。

【0004】

現在、各国で分析1のSNPs探索が、DNAシーケンシングやSSCP (single strand conformation polymorphism analysis) を用いて実行されている。また、分析3では、最近、疾患遺伝子の同定法に於いてSNPs解析による体系的な遺伝子マッピングを行なう方法が議論に上っており、よりスループットの高い、より確実なSNPsタイピング方法（変異の在るであろう位置での変異の有無を調べる方法）の開発が必須と考えられ、現段階でも種々の分析法が提案されている。

【0005】

例えば、(1) 特定の塩基配列に特異的にハイブリダイズするジェノタイピングプライマー (Genotyping primer) を標的 (ターゲット) DNAにハイブリダイズさせて相補鎖伸長反応を行ない、変異の有無により生じた相補鎖伸長反応生成物をゲル電気泳動で分析するSNP-ARMS (Amplification refractory mutation system) 法、(2) プライマーを標的DNAにハイブリダイズさせて1塩基だけ相補鎖伸長反応を行ない、相補鎖伸長反応生成物を質量分析するMAL

D I - T O F / M S 法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectroscopy)、(3) DNAプローブがミューテーションの期待される位置で酵素切断されるように工夫し、酵素による分解物を蛍光標識して高感度に分析する Taqman PCR法、(4) Taqman PCR法に於いて2種類の非蛍光標識オリゴを用いるインベダー (Invader) 法 (The Scientist 13, 16(1999))、(5) 環状1本鎖DNAの生成の有無に基づく増幅反応により SNPs の存在を調べる RCA (Rolling circle amplification) 法、(6) 標的DNAにプライマーをハイブリダイズさせ、相補鎖伸長反応で生成するピロリン酸をアデノシン5' - 三リン酸に変換して、アデノシン5' - 三リン酸をルシフェリン等の発光試薬と反応させ生成する発光の強度を計測して、プライマーの隣接部位から、順次、塩基配列を決定して行くピロシーケンシング (pyrosequencing) 法 (Anal. Biochemistry 280, 103-110(2000)) 等がある。これら各方法については、「ポストシーケンスのゲノム科学 (1) SNP 遺伝子多型の戦略」(中村祐輔編集、pp.93-pp.149(2000年)、中山書店、東京) に詳述されている。

【0006】

なお、被検核酸の各塩基に相補的な塩基が被検核酸の塩基とハイブリダイズし、プライマーの一方向の伸長反応に伴って、n個の塩基伸長により遊離するn個のピロリン酸を、発光反応により観察する記載がある(特開平07-203998号公報)。また、試料中に存在するピロリン酸をピロフォスファターゼ等により予め酵素的に分解除去する記載がある(特開平08-000299号公報)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

前述の分析2では、膨大なDNA試料について、膨大な部位のSNPsを調べることが必要である。例えば、ある病気のグループに属する多数の患者のSNPs分析と、コントロール(対照)としての多数の正常な人のSNPs分析とを、膨大な回数行ない、両結果を比較検討して注目するSNPsが医療的に意味のあるSNPsである否かを調べていく必要がある。そのために、ランニングコストが安く、非常にスループットの高い装置システムの開発が必要であるという問題

がある。

【0008】

また、患者の特性毎に分類した多数のDNA試料を混合してSNPsを検出して変異の起こる確率を調べ、この確率と病気または医薬品に対する感受性との相関等を調べる必要がある。このために、定量分析の精度の高い分析方法が必要であるが、現在、このような方法は存在しない。

【0009】

従来技術の中で、低ランニングコストでかつ高スループットな装置になり得る手法はピロシーケンシング法である。ピロシーケンシング法は、高圧電源、レーザー光源、蛍光色素、高価な質量分析装置等を必要とせず、小型化・低コスト化が容易である。ピロシーケンシング法では、不純物、不純物による望まない化学変化により生成するピロリン酸（以下、PPiという）、使用する試薬キットに不純物として含まれるPPi、アデノシン5'-三リン酸、(adenosine 5'-triphosphate)（以下ATPという）等による検出限界があるという問題がある。特に、DNAポリメラーゼを用いた相補鎖伸長反応の基質であるデオキシヌクレオチド（核酸基質、dNTPs：N=A、C、G、T）に含まれるPPiにより、伸長した核酸基質の検出限界があるという問題がある。

【0010】

本発明の目的は、ランニングコストが安く、定量精度に優れ、検出限界の向上による高感度検出、スループットの高いSNPs分析を可能とする核酸塩基配列の解析方法、これに用いる試薬キットおよびこの解析方法を実施するための解析装置を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明は、ピロシーケンシング法に適用される核酸塩基配列解析法、試薬キットおよびこの解析方法を実施するための解析装置である。また、本発明は、SNPs発現頻度分析法（BAMPER法：Bioluminescence of Artificial Mismatch Primer Extension Reaction）（特願2000-300577）に適用される核酸塩基配列解析法、試薬キットおよびこの解析方法を実施するための解析

装置である。

【0012】

BAMPER法では、プライマーの3'末端から2塩基目、または、3塩基目の塩基が、標的核酸（1本鎖DNA試料）の塩基と相補的でない塩基に人為的に置換された人工ミスマッチプライマーが使用される。人為的に置換された塩基は、標的核酸に相補鎖結合した人工ミスマッチプライマーの伸長反応を進行させたり、進行させなかったりする確実なスイッチング特性を与えている。

【0013】

BAMPER法では、相補鎖伸長を連続して数百塩基行ない、PPiを大量に生成して、化学発光反応により生じる発光を検出するので、高い検出感度を得られ、微量の1本鎖DNA試料への適用、変異の検出への適用が可能である。ピロシーケンシング法と同様に、BAMPER法でも、使用する試薬に不純物として含まれるPPiやATPが検出限界を決めている。

【0014】

本発明の核酸塩基配列解析法では、DNAプライマーの伸長反応に使用される試薬、および、ピロシーケンシング法に使用される試薬に含まれるPPiをピロフォスファターゼ（Pyrophosphatase、以下、PPaseという）を用いて分解する前処理、または／および、上記の試薬に含まれるATPをアピラーゼを用いて分解する前処理が実行される。本発明の核酸塩基配列解析法は、核酸の塩基配列を解析する方法、核酸塩基の多型を解析する方法、核酸塩基の多型の発現頻度を解析する方法に適用できる。

【0015】

本発明の試薬キットは、PPase、および／または、アピラーゼを含んでおり、試薬に不純物として含まれるPPiやATPを効率よく分解しているので、高感度検出、定量精度の向上が実現できる。また、低ランニングコスト、高スループットが実現できる。

【0016】

SNPs分析では遺伝子変異（ミューテーション）の有無を調べれば良いので、本発明では、DNAのSNPs部位に特異的にハイブリダイズし、ミューテ-

ションの有無によって相補鎖伸長反応を制御し得るプライマーを用いて、このプライマーの伸長反応により生じた P P i を、ルシフェラーゼを使用する化学発光反応により高感度検出する。試料 D N A に注目するミューテーションが存在すると、連続する伸長鎖の形成に伴う化学発光を検出できる。

【 0 0 1 7 】

変異のないワイルドタイプ D N A と変異のあるミュータント D N A の各々に特異的なプライマーを用意して S N P s 分析を行なうと、ミュータントとワイルドタイプの存在量を別々に知ることができるので、混合試料を用いてもミュータントとワイルドタイプの存在比等を調べることができる。

【 0 0 1 8 】

B A M P E R 法に本発明を適用する場合には、相補鎖伸長反応により連続してプライマーの伸長反応を行ない、多数の P P i を発生させて化学発光反応を行なうので、ピロシーケンシング法より 2 桁以上の高感度が得られる。

【 0 0 1 9 】

本発明の実施の形態を列挙すると以下のものである。

【 0 0 2 0 】

(1) 本発明の核酸塩基配列解析方法では、標的核酸 (D N A または R N A) に相補鎖結合した D N A プライマーの伸長反応に使用される試薬に含まれる P P i を P P a s e を用いて分解する前処理、または / および、試薬に含まれる A T P をアピラーゼ (Apyrase) を用いて分解する前処理が実行される。前処理の後に、P P a s e、または / および、アピラーゼを取り除く処理を行うが、P P a s e、または / および、アピラーゼは、例えば、担体に固定されており、担体はビーズ、磁気ビーズ等からなり、P P a s e、または / および、アピラーゼの各試薬溶液への添加、各試薬溶液からの取り出しが容易である。前処理が実行され、且つ前処理後の P P a s e、または / および、アピラーゼを取り除く処理が終わった後に、伸長反応を行なわせ、これにより生成される P P i による化学発光が検出される。

【 0 0 2 1 】

(2) 本発明の核酸塩基配列解析方法は、少なくとも 1 種類のデオキシヌクレ

オチド (dNTP、N=A、C、G、T) をその種類毎に含む溶液のそれぞれに、または、少なくとも1種類のデオキシヌクレオチドの類似体を含む少なくとも1種類のデオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、(a) P P a s e を添加して、それぞれの溶液に含まれる P P i を分解する前処理、または／および、(b) アピラーゼを添加して、それぞれの溶液に含まれる A T P を分解する前処理が実行される。(1)の場合と同様に、前処理の後に、P P a s e、または／および、アピラーゼを取り除く処理を行う。

【0022】

DNAプライマー、DNAポリメラーゼおよび前処理された少なくとも1つの溶液を用いて、標的核酸 (DNAまたはRNA) に相補鎖結合したDNAプライマーが伸長反応により伸長される。伸長反応により生じた P P i が、アデノシン-5'-ホスホ硫酸 (Adenocine-5'-phosphosulfate、以下 A P S という) および A T P スルフリラーゼ (ATP sulfurylase) の存在下で、A T P に変換され、次いで、A T P、発光酵素 (例えば、ルシフェラーゼ: luciferase)、発光基質 (例えば、ルシフェリン: luciferin) を含む化学発光反応により発光し、これによる発光が検出される。

【0023】

この例では、プライマーの3'末端の塩基が、標的核酸の1塩基多型部位の3'末端側の1つ手前の塩基に相補的である。また、DNAプライマーの3'末端から2塩基目、または、3塩基目の塩基が標的核酸の塩基配列と相補的でない塩基に置換されている。

【0024】

(3) 本発明の核酸塩基配列解析方法は、デオキシアデノシン5'- α -チオ-三リン酸もしくは、デオキシアデノシン5'- α -チオ-トリフォスフェイト (deoxy adenosine 5'-triphosphate α S-sulphate、以下 d A T P α S という) を含む溶液、デオキシチミジン5'-三リン酸 (deoxy thiamine 5'-triphosphate、以下 d T T P という) を含む溶液、デオキグアノシン5'-三リン酸 (deoxy guanosine 5'-triphosphate、以下 d G T P という) を含む溶液、デオキシシチジン5'-三リン酸 (deoxy cytidine 5'-triphosphate、以下 d C T P

という)を含む溶液のそれぞれに、(a) P P a s e を添加して、溶液のそれぞれに含まれる P P i を分解する前処理、または／および、(b) アピラーゼを添加して、溶液のそれぞれに含まれる A T P を分解する前処理が実行される。前処理の後、(1)の場合と同様に、溶液のそれぞれの中の P P a s e またはおよびアピラーゼを除去する。

【0025】

DNAプライマー、DNAポリメラーゼおよび前処理された少なくとも1つの溶液を用いて、標的核酸(DNAまたはRNA)に相補鎖結合したDNAプライマーが伸長反応により伸長される。伸長反応により生じた P P i が、A P S および A T P スルフリラーゼの存在下で、A T P に変換され、A T P、ルシフェラーゼ、ルシフェリンを含む化学発光反応により発光し、これによる発光が検出される。

【0026】

(4) 本発明の核酸塩基配列解析方法は、d A T P α S、d T T P、d G T P、d C T P を含む溶液に、(a) P P a s e を添加して、溶液に含まれる P P i を分解する前処理、または／および、(b) アピラーゼを添加して、溶液に含まれる A T P を分解する前処理が実行される。(1)の場合と同様に、前処理の後、P P a s e、または／および、アピラーゼを取り除く処理を行う。

【0027】

DNAプライマー、DNAポリメラーゼおよび前処理された溶液を用いて、標的核酸(DNAまたはRNA)に相補鎖結合したDNAプライマーが伸長反応により伸長され、伸長反応により生じた P P i が、A P S および A T P スルフリラーゼの存在下で、A T P に変換され、A T P、ルシフェラーゼ、ルシフェリンを含む化学発光反応により発光し、これによる発光が検出される。

【0028】

この例では、DNAプライマーの3'末端から2塩基目、または、3塩基目の塩基が標的核酸の塩基配列と相補的でない塩基に置換されている。伸長反応による伸長鎖を5'末端から、5' \rightarrow 3' エクソヌクレアーゼ反応で分解し、DNAプライマーを標的核酸に繰り返し相補鎖結合させて伸長反応を行ない、化学発光

反応により生じた発光が検出される。

【0029】

(5) 本発明の核酸塩基配列解析方法は、デオキシアデノシン 5' -三リン酸 (deoxy adenosine 5' -triphosphate, 以下 d A T P という)、d T T P、d G T P、d C T P を含む溶液に、(a) P P a s e を添加して、溶液に含まれる P P i を分解する前処理、または／および、(b) アピラーゼを添加して、溶液に含まれる A T P を分解する前処理が実行される。(1) の場合と同様に、前処理の後に、P P a s e、または／および、アピラーゼを取り除く処理を行う。

【0030】

D N A プライマー、D N A ポリメラーゼおよび前処理された溶液を用いて、標的核酸 (D N A または R N A) に相補鎖結合した D N A プライマーの伸長反応が実行され、これにより生成される P P i による化学発光が検出される。

【0031】

この例の場合、d A T P、d T T P、d G T P、d C T P の何れかの代りに類似体を使用できる。

【0032】

この例では、D N A プライマーの 3' 末端から 2 塩基目、または、3 塩基目の塩基が標的核酸の塩基配列と相補的でない塩基に置換されている。伸長反応による伸長鎖を 5' 末端から、5' → 3' エクソヌクレアーゼ反応で分解し、D N A プライマーを標的核酸に繰り返し相補鎖結合させて伸長反応を行ない、化学発光反応により生じた発光が検出される。

【0033】

(6) 本発明の核酸塩基配列解析方法は、d A T P、d T T P、d G T P、d C T P を含む溶液に、(a) P P a s e を添加して、溶液に含まれる P P i を分解する前処理、または／および、(b) アピラーゼを添加して、溶液に含まれる A T P を分解するが実行される。(1) の場合と同様に、前処理の後に、P P a s e、または／および、アピラーゼを取り除く処理を行う。

【0034】

この例では、相補鎖伸長能力を有し 5 塩基長から 8 塩基長の範囲の第 1 のオリ

ゴマーと、標的核酸（DNAまたはRNA）に相補鎖結合し相補鎖伸長能力のない第2のオリゴマーとを直列に標的核酸に相補鎖結合させ、DNAポリメラーゼ、前処理された溶液を用いて、第1のオリゴマーの伸長反応を行なう。伸長反応により生じるPPiが化学発光反応により検出される。

【0035】

この例の場合、dATP、dTTP、dGTP、dCTPの何れかの代りに類似体を使用できる。第1のオリゴマーの3'末端から2塩基目、または、3塩基目の塩基が標的核酸の特定の領域の塩基配列と相補的でない塩基に置換されている。

【0036】

上述の（1）－（6）の実施形態においては、全ての場合に前処理の後に、PPase、または／および、アピラーゼを取り除く処理を行うものとして説明したが、これに代えて、PPase、または／および、アピラーゼを失活させる薬剤を加えても良い。さらには、具体例を後で示すように、PPase、または／および、アピラーゼが少量なら残っていても特に支障が無いので、前処理のために加える量によっては、前処理の後にPPase、または／および、アピラーゼを取り除く処理を省略しても良い。

【0037】

（7）本発明の試薬キットは、少なくとも1種類のデオキシヌクレオチド（dNTP、N=A、C、G、T）をその種類毎に含む溶液のそれぞれに、または、少なくとも1種類のデオキシヌクレオチドの類似体を含む少なくとも1種類のデオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、PPaseを有する。

【0038】

（8）本発明の試薬キットは、少なくとも1種類のデオキシヌクレオチド（dNTP、N=A、C、G、T）をその種類毎に含む溶液のそれぞれに、または、少なくとも1種類のデオキシヌクレオチドの類似体を含む少なくとも1種類のデオキシヌクレオチドをその種類毎に含む溶液のそれぞれに、PPaseを有する。試薬キットにDNAポリメラーゼを含む溶液を加えても良い。

【 0 0 3 9 】

(9) 本発明の試薬キットは、 $dATP\alpha S$ 、 $dTTP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ 、 $PPase$ を有する。 $PPase$ は担体に固定されている。

【 0 0 4 0 】

(1 0) 本発明の試薬キットは、 $dATP$ 、 $dTTP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ 、および、 $PPase$ または／およびアピラーゼを有する。 $dATP$ 、 $dTTP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ の何れかの代りに類似体を使用できる。

【 0 0 4 1 】

なお、(7) から (1 0) の本発明の試薬キットは、標的核酸に相補鎖結合したDNAプライマーの伸長反応により生じた PPi が、化学発光反応により生じる発光により検出される核酸塩基配列解析方法に使用される。

【 0 0 4 2 】

(1 1) 本発明の試薬キットは、DNAポリメラーゼ、DNAプライマー、 APS 、 ATP スルフリラーゼ、発光酵素、発光基質、アピラーゼの少なくとも1つ、および、 $PPase$ を有し、標的核酸に相補鎖結合したDNAプライマーの伸長反応により生じた PPi が ATP に変換され、 ATP 、発光酵素、発光基質を含む化学発光反応により生じた発光が検出される核酸塩基配列解析方法に使用される。 $PPase$ 、または／および、アピラーゼは担体に固定されている。

【 0 0 4 3 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施例を図を参照して詳細に説明する。

【 0 0 4 4 】

(実施例 1)

実施例 1 では、DNA試料（標的（ターゲット）DNA）にハイブリダイズしたプライマーを伸長させ、伸長に応じて生成する多量の PPi を化学発光反応により検出する。化学発光反応を用いた検出は、本来、非常に高感度であるが、試薬に含まれる種々の不純物が発光源となり、ノイズを含むものとなることも多い。高感度計測では、これら不純物を分解し試薬から除去することが重要である。高感度計測を達成することで、微量の試薬と試料で分析を実行できるので安価な

検査システムが実現する。種々の検討からノイズとなる不要発光の原因は、使用する試薬 dNTP (N=A、C、G、T) に含まれる PPi や、ポリメラーゼ等の酵素に含まれる ATP であることが判明した。従って、予め、使用する試薬に含まれる不純物である ATP、PPi を分解し試薬から除去した後に化学発光反応を行ない、発光を測定することが重要となる。

【0045】

図1は、本発明の実施例1に於ける相補鎖伸長により生成する PPi を化学発光反応により検出する核酸塩基配列解析方法での、ノイズを低減するための試料溶液調整法を説明するフロー図である。核酸 (DNA、RNA) の試料溶液調整法では、DNA 試料の基になる血液 101 から DNA 102 (2本鎖DNA) を抽出する。DNA 102 の必要な領域部分を PCR 103 等で増幅して試料として用いる。増幅後、磁気ビーズ等を用いて1本鎖DNA 104 とする。1本鎖DNA 104 を含む溶液には、増幅反応で用いた dNTPs や増幅反応で生じた PPi が除去しきれずに含まれていることがある。そこで、アピラーゼ (Apyrase) 105 および PPase 106 の酵素を1本鎖DNA 104 を含む溶液に加えて、溶液に残存する dNTPs や PPi を分解する前処理を行なう。Apyrase 105 および PPase 106 の酵素は、以後の計測では妨害になるので溶液から取り除く (107)。Apyrase 105 および PPase 106 の酵素が取り除かれた、1本鎖DNA 104 を含む溶液に、プライマー 117 を加え、1本鎖DNA 104 とプライマー 117 とが混合され、1本鎖DNA 104 にプライマー 117 がハイブリダイズしたDNA試料溶液 118 を得る。

【0046】

相補鎖伸長反応および化学発光反応に用いる混合溶液 108 は、伸長酵素、硫酸還元酵素、発光基質、発光酵素、酵素安定化剤、酵素活性化剤等を含む試薬キットであり、混合溶液 108 に含まれる ATP、PPi がノイズの原因となるので、Apyrase 105 および PPase 106 の酵素で処理して、溶液 108 に含まれる ATP や PPi を分解する前処理を行なう。この場合、これらの内、伸長酵素および硫酸還元酵素は相対的にノイズの原因となる ATP、PPi を

多く含むので、これらを他のものと分けて、これらのみに対して前処理を行なうものとしても良い。また、相補鎖伸長反応のための核酸基質を含む溶液109も、核酸基質(dNTPs)の熱分解等で生じたPPiを多く含み、ノイズの要因となる。従って、核酸基質を含む溶液109に対してもApyrase105およびPPase106の酵素で処理して、溶液109に含まれるPPiを分解する前処理を行なう。前処理で使用したApyrase105およびPPase106の酵素は、以後の計測では妨害になるので、DNA試料溶液の作成時と同様に、溶液108、109から取り除く(107)。この前処理がなされた溶液110、111を、DNA塩基配列解析に用いる。

【0047】

1本鎖DNA104にハイブリダイズしたプライマー117を含む溶液118、試薬キットである溶液108をApyrase105およびPPase106の酵素で処理した溶液110、核酸基質を含む溶液109をApyrase105およびPPase106の酵素で処理した溶液111を混合して、伸長反応112を行なう。プライマー117の伸長により生じるPPiを、化学発光反応による発光113として検出する(114)。

【0048】

図2は、本発明の実施例1に於ける、プライマーの1塩基伸長により生じるPPiを化学発光反応により検出する原理を説明する図である。1本鎖DNA試料201をタイタープレート等に入れて分析するが、一度に種々の試料をタイタープレートの各ウェルに入れ、同時に分析するのが通例である。タイタープレートのウェルに、1本鎖DNA試料201、プライマー202、核酸基質であるdNTPs203、DNAポリメラーゼ204、APS(Adenosine 5'-phosphosulfate)207、ATPスルフリラーゼ(ATP sulfuryrase)208、ルシフェリン(luciferin)212、ルシフェラーゼ(luciferase)214等を加える。

【0049】

図2(A)は、1本鎖DNA201にハイブリダイズしたプライマー202が1塩基伸長し、PPi205が生成する化学反応を示す。図2(B)は、図2(A)に示す化学反応で生成したPPi205(図2(B)では参照符号206と

した) が、ATPスルフィラーゼ 2 0 8 の作用でAPS 2 0 7 と反応し、ATP 2 0 9 と硫酸イオン 2 1 0 を生成する化学反応を示す。図 2 (C) は、図 2 (B) に示す化学反応で生成したATP 2 0 9 (図 2 (C) では参照符号 2 1 1 とした) が、ルシフェリン 2 1 2 と酸素 2 1 3 とルシフェラーゼ 2 1 4 の存在下で反応し、5' - アデニル酸 (Adenosine 5' -monophosphate、以下AMP という) 2 1 5、PPi 2 1 6、オキシルシフェリン 2 1 7、二酸化炭素 2 1 8、1 個の光子 ($h\nu$) 2 1 9 を生ずる化学反応を示す。

【 0 0 5 0 】

ルシフェリン 2 1 2 はルシフェラーゼ 2 1 4 の存在下で酸素分子 2 1 3 によって酸化される時の自由エネルギーで励起され、可視光を発して基底状態に戻る。1 分子のルシフェリン 2 1 2 の酸化によって1 個の光子 ($h\nu$) 2 1 9 が化学発光として放出される。この化学発光の光量を測定することにより、dNTPs 2 0 3 がDNA鎖に取り込まれ相補鎖が伸長していることを知ることができる。

【 0 0 5 1 】

図 2 (C) に示す化学反応で生成したPPi 2 1 6 は、図 2 (B) に示す化学反応におけるPPi 2 0 6 として、再度、APS 2 0 7 と反応し、ATP 2 0 9 を生成する。この結果、図 2 (C) に示す化学反応が起こり、光子 ($h\nu$) 2 1 9 を生ずる。即ち、図 2 (A) に示す化学反応により、DNA鎖への1 個の核酸基質の取り込みにより1 分子のPPi 2 0 5 が生成された結果、図 2 (B)、図 2 (C) に示す化学反応が繰り返し起こることとなり、光子 2 1 9 を放出する反応が繰り返される。その結果、1 つの核酸基質の取り込みで多数の光子が放出される。図 2 に示す化学発光反応は光源を必要とせず、基本的にノイズが無く高感度の信号が得られる。

【 0 0 5 2 】

先に説明したように、図 2 に示す化学発光反応で使用する各種の試薬に不純物として含まれるATPやPPiは、ノイズの原因となる。実施例 1 では、図 1 で説明したように、各種の試薬、反応溶液の前処理を行なう。

【 0 0 5 3 】

図 3 は、本発明の実施例 1 に於ける、試薬 (相補鎖伸長反応および化学発光反

応に必要な試薬の混合溶液108、dNTPsを含む溶液109)およびDNA試料104に含まれる不純物の分解を、固相または膜を用いて、PPaseおよび/またはApyraseにより行なう前処理法の例およびそのための前処理装置の例を模式的に説明する図である。

【0054】

図3(A)に示す前処理の例では、前処理を施していない試薬108、109またはDNA試料104を含む溶液303を収納する容器350に、Apyrase301が固定されたビーズ等の担体311を含む試薬キット、PPase302が固定されたビーズ等の担体312を含む試薬キットを添加して、試薬108、109またはDNA試料118を含む溶液303に含まれる不純物を分解して除去する。

【0055】

不純物のATP305はAMP309、無機リン酸(以下Piという)310に分解される。不純物のdNTP304はデオキシヌクレオチド1リン酸(dNMP)308、Pi310に分解される。不純物のPPi306はPi310に分解される。この後、容器350から、担体311、312を除去することにより、前処理が完了する。

【0056】

なお、上記の例では、Apyrase301が固定された担体311を含む試薬キット、PPase302が固定された担体312を含む試薬キットを使用した。が、Apyrase301およびPPase302が固定された担体を含む試薬キットを使用しても良い。

【0057】

また、前処理後に、容器350から、担体31、312を除去するのに代えて、容器350にApyraseの阻害剤およびPPaseの阻害剤を添加しても良い。

【0058】

図3(B)に示す前処理の例では、試薬108、109またはDNA試料104を含む溶液303を反応容器や試料容器に供給する細管360の内部またはピ

ペット先端部の内壁部の固相表面 3 1 3 に、A p y r a s e 3 0 1、P P a s e 3 0 2 を固定しておき、前処理を施していない試薬 1 0 8、1 0 9 または DNA 試料 1 1 8 を含む溶液 3 0 3 を細管の内部に流入させて、細管の内部を試薬 1 0 8、1 0 9 または DNA 試料 1 0 4 を含む溶液 3 0 3 が流下する過程で、図 3 (A) と同様の前処理を行なわせて、試薬 1 0 8、1 0 9 または DNA 試料 1 0 4 を含む溶液 3 0 3 に含まれる不純物を分解し、前処理済みの溶液 3 0 7 を反応容器や試料容器に供給する。ここで言う細管は、いわゆるキャピラリーであり、溶液 3 0 3 の配送路に配送路の太さ分だけの太い束にして配置されるものとするれば良い。

【 0 0 5 9 】

なお、固相表面 3 1 3 に、A p y r a s e 3 0 1、P P a s e 3 0 2 を固定したが、何れか一方を固定しても良い。

【 0 0 6 0 】

図 3 (C) に示す前処理の例では、少なくとも 1 種類の d N T P あるいはその類似体を含む前処理を施していない試薬 1 0 9 を含む溶液 3 0 3 を収納する容器 3 7 0 に、A p y r a s e 3 0 1、P P a s e 3 0 2 を添加して、図 3 (A) と同様の前処理を行ない、試薬 1 0 9 を含む溶液 3 0 3 に含まれる不純物 P P i および A T P の分解を行なった後に、分子量選択透過膜（フィルタ）3 1 4 を用いて、前処理済みの溶液 3 0 7 を回収する。d N T P s の平均分子量は約 5 7 0 なので、NWML (Nominal molecular weight limit in Daltons) = 1 0, 0 0 0 の膜を用いれば、P P a s e (MW = 7 0, 0 0 0) および A p y r a s e (MW = 5 0, 0 0 0) と完全に分離することができる。なお、前処理を施していない試薬 1 0 8、1 0 9 または DNA 試料 1 0 4 を含む溶液 3 0 3 を収納する容器 3 5 0 に、A p y r a s e 3 0 1、P P a s e 3 0 2 を添加したが、何れか一方を添加しても良い。

【 0 0 6 1 】

なお、図 3 では、前処理を施していない試薬 1 0 8、1 0 9 または DNA 試料 1 0 4 を含む溶液 3 0 3 に対する前処理について説明したが、d N T P s の類似体、プライマー、A P S、A T P スルフリラーゼ、ルシフェリン、ルシフェラー

ぜ等の図2で説明した化学反応を進めるための試薬についても、同様に前処理を行うものとするのができるのは言うまでもない。

【0062】

実施例1では、PPaseおよびdATP α S (dATP類似体) (deoxy adenosine 5' -triphosphate α -sulphate) を含む試薬キット、PPaseおよびdTTP (deoxy thiamine 5' -triphosphate) を含む試薬キット、PPaseおよびdGTP (deoxy guanosine 5' -triphosphate) を含む試薬キット、PPaseおよびdCTP (deoxy cytidine 5' -triphosphate)を含む試薬キットの4種のキットを使用する。これら4種のキットでPPaseは、ビーズ等の担体に固定されていても良い。

【0063】

図4は、本発明の実施例1に於ける、PPaseによる前処理の有無によるノイズ信号の比較例を示す図である。本発明で使用する試薬の中では、4種のdNTPs (図1: 109、図2: 203) が熱分解等によりPPiを生成するので、最も大きなノイズ信号源となる。試薬の購入先、製造方法、ロット、保管条件の違い等により、4種のdNTPsまたはそれらの類似体に不純物として含まれるPPiの量は異なる。

【0064】

図4に示す結果例は、次の条件下で得られた。dATP α Sは1社から購入した2ロット、dGTPは3社から購入した4ロット、dTTPは2社から購入した各1ロット、dCTPは3社から購入した4ロットの各ロットを、PPaseによるPPiの分解を行なう前処理の有無の2通りについてそれぞれプライマーの伸長が起こらない条件下で、図2(B), (C)に示す化学発光反応で検出されたノイズとなる発光信号強度の平均値を示す。図4の縦軸は、検出されたノイズ信号の最大値を1.0とする規格化をしている。

【0065】

図4の結果に示すように、試薬に含まれるPPiの量が異なっても、PPiはPPaseで殆ど分解されて、ノイズ発光信号強度は十分無視できる程度の強度になる。特に、dCTPの場合には、ノイズ信号強度はPPaseで前処理

のなされる前の約 8 0 分の 1 である。

【0 0 6 6】

図 5 は、本発明の実施例 1 に於ける P P a s e による前処理によるノイズ信号の d C T P の濃度依存性の例を示す図である。使用する d N T P s の濃度に伴い、不純物として含まれる P P i の量は変化するが、濃度 4 n M から濃度 2 6 0 n M の範囲で、P P a s e による前処理により、不純物として含まれる P P i を無視できる程度に分解できることがわかる。図 5 の中の小さいグラフは、原点近傍のデータを拡大して示すグラフである。図では、実際の計測結果はもっと少ないものであったが、分かりやすくするために、前処理の結果のノイズ信号をやや誇張して表示した。

【0 0 6 7】

図 4、図 5 に示す結果から、P P a s e が含まれる試薬キットの使用により、不純物の P P i に起因するノイズ信号を実用上無視できる程度に分解できることが示された。

【0 0 6 8】

本発明で使用される試薬キットは、混合溶液 1 0 8 に含まれる個々の試薬（酵素、基質、安定化剤、活性化剤等）に、A p y r a s e、および／または、P P a s e が付加され、あるいは、これらが固定された担体が添加されたものとして構成される。

【0 0 6 9】

以上説明したように、ノイズ信号の発生の原因となる不純物 A T P および／または P P i の分解により、非常に高感度が達成される。例えば、2 0 0 塩基の相補鎖伸長を伴う D N A 鎖の検出では、3 0 0 f m o l の検出が可能であった。

【0 0 7 0】

図 6 は、本発明の実施例 1 に於ける、ピロシーケンシングを実行する核酸塩基配列解析装置の構成例を示す模式図である。図 6 に示すように、ピロシーケンシング法では、相補鎖伸長反応に際し、d A T P α S、d T T P、d G T P、d C T P の 4 種類の基質を 1 種類ずつ、順次、反応槽 6 0 1 の反応溶液に注入する。注入された基質が相補鎖伸長反応に使用されると P P i が生じて発光を生じる。

その発光量はフォトセンサー 6 0 2 で検出され、増幅器 6 0 3 で増幅され、電流電圧変換後、測定系の外部からのノイズを除くためにローパスフィルター 6 0 4 を通してデータ処理装置 6 0 5 に取り込み、データ処理して表示、保存される。相補鎖伸長反応により 1 種の塩基（基質）が DNA 鎖に取り込まれる毎に、発光量の検出が繰り返される。

【 0 0 7 1 】

発光量の検出を行なう反応溶液に残存する d N T P s は、次に加えられる核酸基質（塩基）が取り込まれるか否かを調べるのに大きな影響を与える。そこで、d N T P s や A T P を分解する A p y r a s e を反応溶液に加えておき、一定時間後（10 秒程度以内）に、加えた d N T P s や A T P が全て分解するようにすると、A T P は、ルシフェラーゼの化学発光反応（図 2（C））、および A p y r a s e による分解反応（図 3）で競合して消費される。

【 0 0 7 2 】

ピロシーケンシング法では、1 種の塩基の伸長により生成した P P i を化学発光反応により順次検出するが、反応溶液に A p y r a s e を存在させて発光の持続時間を短縮させ、シーケンシングのスループットを向上させている（Science 281, 363-364(1998)）。

【 0 0 7 3 】

図 7 は、本発明の実施例 1 に於ける、ピロシーケンシング法による伸長鎖の検出例を説明する図である。プライマー 7 0 2 が結合した 1 本鎖 DNA 試料 7 0 1 を含む反応溶液に、順次、核酸基質 d N T P s を加えて化学発光反応による発光の有無を調べる。図 7 に示す例では、最初に、d A T P α S 7 0 3 を添加するが、この場合、基質 A と標的 DNA 鎖は相補的でなく、相補鎖伸長反応は起こらない。よって核酸基質が DNA 鎖に取り込まれないので P P i は生成せず、発光は生じない。反応溶液に存在する d A T P α S 7 0 3 は、反応溶液に存在する A p y r a s e により分解される。次に添加された d C T P 7 0 4 も標的 DNA 鎖に相補的でなく伸長反応が起きないので、d A T P α S 7 0 3 と同様に、A p y r a s e により分解される。d T T P 7 0 5 が反応溶液に添加された場合は、標的 DNA 鎖と相補的で、伸長鎖 7 0 6 が形成され、P P i 7 0 7 が生成し、発光 7

08が生じる。残存するd TTP 705はApyraseにより分解される。d GTP 709が反応溶液に添加された場合には、伸長鎖が形成されず、d GTP 709はApyraseにより分解される。次にd ATP α S 710が添加されると伸長鎖711が形成され、PPi 712が生成し発光713が生じる。

【0074】

核酸基質(d ATP α S、d CTP、d GTP、d TTP)を含む試薬には不純物としてPPiが含まれており、ノイズ信号の原因となる。本発明では、ピロシーケンシング法の実施に先立って、使用される全ての試薬に、予めPPase、またはPPaseが固定された担体を添加して、各試薬に不純物として含まれるPPiを分解する。また、d NTP以外の各試薬には、予めApyrase、またはApyraseが固定された担体を添加して、各試薬に不純物として含まれるATPを分解しておく。

【0075】

あるいは、本発明のピロシーケンシング法の実施に於いては、PPase、またはPPaseが固定された担体が添加された試薬キットを使用する。ピロシーケンシング法で使用される全ての試薬の各々に、PPase、またはPPaseが固定された担体が添加された試薬キットが提供される。また、d NTPs以外の試薬の各々に、Apyrase、またはApyraseが固定された担体が添加された試薬キットが提供される。

【0076】

なお、図2に示す、4種類の核酸基質(d NTPs) 203の少なくとも1種類、例えば、d ATPの代りに、その類似体d ATP α Sを使用することもできる。

【0077】

本発明の試薬キットの使用により、試薬に含まれる不純物PPi、ATPを分解するので、測定感度が向上し、測定の信頼性の向上が図れる。

【0078】

(実施例2)

実施例2はSNPs分析に関する。SNPs分析では、各DNA試料の変異型

(ミュータント)の有無を調べるタイピングに加え、混合ゲノム試料に含まれる特定の変異の存在率や発現頻度 (Frequency) 測定が重要である。SNP s は、核酸の 1 塩基変異であり、人の集団に数%の発現頻度で存在する。1 塩基変異を詳細に調べると、例えば、偏頭痛を持っている人に高発現頻度で現れる変異、たばこを吸うことで癌になり易い人が高い発現頻度で持っている変異等が見つかる。

【 0 0 7 9 】

このように種々の病気や対薬品感受性と関連した SNP s は、医療診断に重要であり、探索がなされている。しかし、膨大な数の SNP s について非常に多数の人々の試料を個々に測定することは手間がかかり、効率は良くない。

【 0 0 8 0 】

そこで、多数の人々の DNA を混合 (pooled sample と呼ばれる) し、含まれる変異の存在率を調べる方法が注目され始めている。ヒト DNA に於ける変異の平均存在率は 5 % 程度であり、変異の発現頻度が病気または対薬品感受性と関連する率は、1 - 2 % である。つまり、平均 5 % の変異と 6 % の変異を区別できる計測が必要となる。しかし、平均 5 % の変異と 6 % の変異を区別できる計測方法、装置は、まだ実現されておらず、重要な課題となっている。この課題に対しても、本発明の方法、試薬キットは有効である。

【 0 0 8 1 】

図 8 は、本発明の実施例 2 に於ける、プライマー伸長法による SNP s 発現頻度の計測方法の例の原理を説明する模式図である。プライマー伸長法による SNP s 発現頻度分析法 (出願番号 2 0 0 0 - 3 0 0 5 7 7) について、以下に説明する。

【 0 0 8 2 】

図 8 (A) に示すように、まず、1 本鎖 DNA 試料 8 0 1 の 1 つの変異部位に、プライマーの 3' 末端 8 0 3 が SNP s のある塩基部位に一致するようにプライマー 8 0 4 を用意する。プライマー 8 0 4 の末端塩基が 1 本鎖 DNA 試料 8 0 1 と相補的な場合のみ相補鎖伸長 8 0 6 が起き、大量の PPi 8 0 7 が生じ大量の発光 8 0 8 が生成する。一方、図 8 (B) に示すように、1 本鎖 DNA 試料 8

02がプライマー804の3'末端塩基805と相補でない場合には相補鎖伸長が起こらない809か、起こっても僅かである。そのため、生じるPPi810も僅かで発光811も僅かである。

【0083】

このようにプライマーの3'末端の塩基種を変えることで、相補鎖伸長反応を起こしたり、起こさなかったりするスイッチの役目を持たせることができる（文献：Kwok, S., et al. *Nucleic Acids Res*, 1990,18,999-1005. Huang, M. M., Arnheim, N., Goodman, M. R., *Nucleic Acids Res*, 1992,20,4567-73）。

【0084】

また、変異部位の検出のために、ワイルドタイプのDNA試料に相補的なプライマーとミュータントのDNA試料に相補的なプライマーの2つを用意することにより、検出精度を向上できる。ピロシーケンシング法が1種の塩基伸長のみで生成したPPiに基づく発光を検出するのに対して、プライマー伸長法による方法では、多数塩基伸長（長い相補鎖の形成）により生成する多数のPPiに基づく化学発光反応を行なうので、発光量が2桁以上大きく、更に、化学発光反応が持続するので非常に高感度な検出が期待できる。

【0085】

更に、高感度化を達成させるためには、プライマーと1本鎖DNA試料とが相補でない場合に僅かに起こるミスマッチによる伸長反応を抑える必要がある。プライマーの3'末端から3塩基目を人為的に1本鎖DNA試料と相補でない核酸塩基となるように設計した人工ミスマッチプライマーを使用することにより、相補鎖伸長反応を起こしたり、起こさなかったりするスイッチング特性をより確実にしたSNPs発現頻度分析法（BAMPER法）がある。

【0086】

BAMPER法では、相補鎖伸長を連続して数百塩基行ない、PPiを大量に生成して化学発光反応により生じる発光を検出するので高い検出感度を得られ、微量の1本鎖DNA試料への適用、変異の検出への適用が可能であるという利点がある。図2に示す、4種類の核酸基質（dNTPs）203の少なくとも1種類を類似体に置換することもできる。例えば、dATPの代りにdATP α Sを

使用する。

【0087】

図2 (B), (C) に示すサイクル反応により発光が持続するので、タイタープレートでの反応を発光の測定系の外部で行ない、発光の測定時に測定系に入れても良い。このようにすると、タイタープレートに保持された96試料または384試料からの化学発光の計測を1分以内に行なうことができ、多数のタイタープレートを、順次、短時間に計測でき非常に高い測定スループットを実現できる。例えば、1分間毎に96試料に関する化学発光の計測を行ない、1日当たり10時間測定すると仮定すると、1日に約6万試料の測定が行える。

【0088】

図9は、本発明の実施例2に於ける、人工ミスマッチプライマーを用いたプライマー伸長法によるSNPs発現頻度の高感度な計測方法(BAMPER法)の例の原理を説明する図である。

【0089】

まず、PCRまたは特異的なDNAプローブをDNA試料とハイブリダイズさせて相補鎖伸長反応により調整された1本鎖DNA試料901を準備する。この1本鎖DNA試料901は、図9 (A) に示すように、1本鎖DNA試料901に核酸塩基906で示す塩基Cが1つのSNPsとして存在するように調整される。

【0090】

次いで、人工ミスマッチプライマー905を用意する。このプライマー905は3'末端903の塩基GがDNA試料901の核酸塩基906と相補であり、3'末端から3つ目の核酸塩基904がDNA試料901と相補でない塩基Aとされる。プライマー905のその他の配列はDNA試料901の配列に相補となるようにされる。

【0091】

このように準備された1本鎖DNA試料901と人工ミスマッチプライマー905とは、図9 (A) に示すように、人工ミスマッチプライマー905の3'末端の塩基Gが1本鎖DNA試料901の塩基C906と相補であり、相補鎖伸長

907が進み、大量のPPi908が生じて発光909が生じる。これにより、1本鎖DNA試料901に1つのSNPsが存在することが確認される。

【0092】

一方、1本鎖DNA試料901を準備したのと同様の手法で、1本鎖DNA試料902を準備する。この1本鎖DNA試料902は、図9（B）に示すように、1本鎖DNA試料901の1つのSNPsがあった部位（塩基c906）には、これに代わる塩基A910が存在するように調整される。

【0093】

1本鎖DNA試料902と人工ミスマッチプライマー905とをハイブリダイズさせようとする、図9（B）に示すように、プライマー905の3'末端の塩基Gが1本鎖DNA試料902の部位910にある塩基Aと相補でないから、プライマー905の3'末端911がほぼ完全に1本鎖DNA902から離れる。そのため、相補鎖伸長は起こらず、図9（A）に示したようなPPiは殆ど生成せず、殆ど発光は生じない。

【0094】

このように、人工ミスマッチプライマー905の3'末端から2～3塩基目の塩基種は相補鎖伸長反応の進行にはあまりに影響を与えないが、人工ミスマッチプライマー905の3'末端の塩基911が1本鎖DNA試料902の塩基910と相補でない場合には、人工ミスマッチプライマー905の3'末端がほぼ完全に1本鎖DNA試料から離れ、ミスマッチによる相補鎖伸長反応が殆ど進行しない状態となる。このため、SNPsの有無の検出が非常に明確となり、検出感度が向上する。

【0095】

図10に、本発明の実施例2に於ける人工ミスマッチプライマーおよび5'→3'エクソヌクレアーゼを用いたプライマー伸長法によるSNPs発現頻度の高感度な計測方法の例の原理を説明する図を示す。この例は、伸长相補鎖を酵素切断して、繰り返し相補鎖伸長反応を行なうことにより、非常に多くの分子数のピロリン酸を生成して検出感度を向上させるものである（特願2000-300577参照）。

【 0 0 9 6 】

まず、最上段に示すように、5' 末端をビーズ等の固体担体 1 5 0 1 に固定した標的 1 本鎖 DNA 1 5 0 2 とプライマー 1 1 7 を DNA ポリメラーゼとともに反応溶液中におく。その結果、図 9 (A) で説明したのと同様に、プライマー 1 1 7 の伸长相補鎖 8 0 6 が形成されるとともに P P i 8 0 8 が生成される。ただし、この実施例では、プライマー 1 1 7 の相補鎖 8 0 6 の伸長段階では発光に関する酵素類は反応溶液に入れない。

【 0 0 9 7 】

次いで、所定の相補鎖 8 0 6 の伸長が進んだ段階で相補鎖伸長反応は終了し、プライマー 1 1 7 の伸长相補鎖 8 0 6 により形成された相補鎖 1 0 0 6 とターゲット DNA 1 5 0 2 による 2 本鎖の DNA が形成される。この状態で、反応溶液中に、相補鎖を酵素切断するためのエキソヌクレアーゼを投入する。この結果、形成された相補鎖 1 0 0 6 は、エキソヌクレアーゼ反応により、1 つずつヌクレオチドに分解され、最終的に標的 1 本鎖 DNA 1 5 0 2 が再生される。

【 0 0 9 8 】

相補鎖を酵素切断するエキソヌクレアーゼについて説明しておく、エキソヌクレアーゼには DNA 鎖の 5' 末端から 3' 末端へ 1 つずつヌクレオチドを分解していく 5' → 3' エキソヌクレアーゼと、DNA 鎖の 3' 末端から分解していく 3' → 5' エキソヌクレアーゼがある。プライマーの 3' 末端のマッチ、ミスマッチを相補鎖合成の有無の検出に利用する場合には、3' → 5' エキソヌクレアーゼは都合が悪い。プライマーのミスマッチ部分が削り取られ、正常 DNA と変異を持つ DNA との差が区別できなくなるからである。5' → 3' エキソヌクレアーゼは、2 本鎖 DNA の 5' 末端から DNA 鎖を分解するが、ターゲット DNA 1 5 0 2 の 5' 末端をビーズ等の固体担体 1 5 0 1 に固定したり、5' 末端を修飾して、5' → 3' エキソヌクレアーゼによりターゲット DNA が分解を受けないようにしておく。3' 末端のミスマッチによる変異の識別を行なう場合には、5' → 3' エキソヌクレアーゼが適している。

【 0 0 9 9 】

反応溶液中に余剰に存在するプライマー 1 1 7 はこのターゲット DNA 1 5 0

2に、再び、ハイブリダイズして、プライマー117の伸長相補鎖1006が再度形成される。これにより新たにPPi808が生成される。

【0100】

プライマー117の伸長相補鎖806の形成により、伸張塩基数に応じたn分子のPPi808が生成され、伸長相補鎖806の形成、相補鎖1006の5'→3'エキソヌクレアーゼ反応による分解の繰り返しをm回行なうものとする、合計m回の伸長相補鎖806の形成により、(m×n)分子のPPi1010が生成されることになる。

【0101】

(m×n)分子のPPi1010が生成された後に、発光に関する酵素類を反応溶液中に投入すると、PPi1010はATPに変換され、ATPはルシフェリンを酸化しPPiを新たに生成する。新たに生成するPPiは、ATPスルフィラーゼの働きで、再び、ATPとなりルシフェリンと反応する。従って、m=10とすれば、1回のPPi生成は1つのDNA相補鎖を作るときに約1000個放出され、これが10回繰り返されるので、発光量はピロシーケンシングなどに比べて10000倍となる。

【0102】

この例でも、図9(B)のように、ターゲットDNA1502にプライマー117をハイブリダイズさせたとき、プライマー117の3'末端のミスマッチがあるときは相補鎖伸長反応は進行しない。プライマー117の3'末端の近傍に、必要に応じて人工的にミスマッチができるように配列を工夫する等により、正確にミューテーションを調べることができる。

【0103】

しかし、図8で説明したプライマー伸長法、図9および図10で説明したBAMPER法の何れの方法に於いても、使用する試薬に不純物としてATPやPPiが含まれており、ノイズ信号の原因となっている。本発明では、図8、図9に示すSNPs発現頻度の分析法に於いてノイズ信号を激減させ、更に検出感度の向上を可能とする。

【0104】

実施例 1 と同様に、図 8、図 9 に示す S N P s 発現頻度の分析の実施に先立って、使用される全ての試薬に予め、P P a s e、または P P a s e が固定された担体を添加して、各試薬に不純物として含まれる P P i を分解する。また、d N T P 以外の各試薬に予め、A p y r a s e、または A p y r a s e が固定された担体を添加して、各試薬に不純物として含まれる A T P を分解しておく。

【0105】

あるいは、図 8、図 9 および図 10 に示す S N P s 発現頻度の分析の実施に於いては、P P a s e、または P P a s e が固定された担体が添加された試薬キットを使用する。図 8、図 9 および図 10 に示す S N P s 発現頻度の分析の実施に於いて、使用される全ての試薬の各々に、P P a s e、または P P a s e が固定された担体が添加された試薬キットが提供される。また、d N T P 以外の試薬の各々に、A p y r a s e、または A p y r a s e が固定された担体が添加された試薬キットが提供される。

【0106】

本発明の試薬キットの使用により、試薬に含まれる不純物 P P i、A T P を分解するので、検出感度が向上し、検出の信頼性の向上が図れる。

【0107】

ところで、ピロシーケンシング法では、反応溶液に A p y r a s e を加え、過剰の d N T P を速やかに分解して、次の反応の邪魔にならないようにしている。この場合、A p y r a s e は A T P も分解するので、A T P は、ルシフェラーゼの化学発光反応（図 3（C））、および A p y r a s e による分解反応（図 3）で競合して消費される。従って、化学発光反応により生じる発光の強度は A p y r a s e を入れない時に比較すると数～数十%になっている。

【0108】

このピロシーケンシング法の反応を利用して塩基配列決定または S N P s 検出を行なう場合には、DNA 試料は 0. 2 p m o l 程度必要となる。

【0109】

本発明では B A M P E R 法に於いて、P P a s e を固定した担体、A p y r a s e を固定した担体を用いて、不純物を分解した後に、P P a s e を固定した担

体、Apyraseを固定した担体を反応溶液から取り出すことにより、相補鎖伸長に伴い放出されたPPiによって生じたATPを無駄なくルシフェリン等の発光基質と反応させることを可能とし、高い検出感度を得られる。

【0110】

図11は、本発明の実施例2に於ける、人工ミスマッチプライマーを用いたプライマー伸長法(BAMPER法)によるSNPs検出での、PPaseによる前処理の効果の一例を示す図である。即ち、本発明の試薬キット使用の有無による、BAMPER法に基づくSNPs発現頻度分析の結果例について説明する。

【0111】

試料として、配列番号1)の配列をもつ、M13mp18の一部の1本鎖DNAを使用した。使用した試料量は0.5fmolである。配列中、下線を付した塩基がSNPs部位である。3'末端がSNPs部位と一致する(相補鎖が伸長する)人工ミスマッチプライマーとして配列番号2)の配列をもつプライマーを、3'末端がSNPs部位と一致しない(相補鎖が伸長しない)人工ミスマッチプライマーとして配列番号3)の配列をもつプライマーを、それぞれ、使用した。なお、配列番号1)、配列番号2)、配列番号3)の配列に於いて、大文字で示す塩基がミスマッチ部位である。

a c a g g a a a c a g c t a t g a c c a t g a t t a c g a a t t c
g a g c t c g g t a c c c g g g g a t c c t c t a g a g t c g a c
c t g c a g g c a t g c a a g c t t g g c a c t G g c c g t c g t
t t t a c a : (配列番号1)

t g t a a a a c g a c g g c G a g : (配列番号2)

t g t a a a a c g a c g g c G a t : (配列番号3)

図11に、伸張が無い条件での本発明による前処理を実行しない場合の発光強度を「前処理無」で示し、本発明のPPaseおよびApyraseを含む試薬キットを用いて、BAMPER法の実施に先立って、BAMPER法で使用する各試薬に対して、不純物を分解する前処理を実行した場合の発光強度を「前処理有」で対比して示したように、「前処理無」はノイズ信号としての発光強度が非常に高く、DNA試料が微量の場合にはSNPs部位の有無による信号を分離で

きないのに対して、「前処理有」ではノイズ信号としての発光強度は微小である。

【0112】

図11には、さらに、伸張が無い条件でのデータをコントロールとして、SNPsが存在するにDNA試料に対して、本発明のPPaseおよびApyraseを含む試薬キットを用いて、BAMPER法を実施して解析したときの伸張による発光強度を「前処理有」として示した。「前処理有」における相補鎖の伸長の有無に対応する発光強度を比較すれば、本発明の効果は明確に理解できる。

【0113】

図12は、本発明の実施例2に於ける、人工ミスマッチプライマーを用いたプライマー伸長法によるSNPs検出とピロシーケンシング法によるSNPs検出の感度の比較例を示す図である。即ち、本発明のPPaseおよびApyraseを含む試薬キットにより前処理した各試薬を用いた場合の、ピロシーケンシング法(Anal Biochemistry 280, 103~110(2000))とBAMPER法によるSNPs検出の結果の一例について、以下説明する。

【0114】

試料として、図11の結果を得た分析と同じ配列番号1の配列をもつ、M13mp18の一部の1本鎖DNAを使用した。使用した試料量は、ピロシーケンシング法では0.5 fmol、150.0 fmolであり、BAMPER法では0.5 fmolである。プライマーとして、ピロシーケンシング法では配列番号4の配列をもつ通常のプライマーを、BAMPER法では図11の結果を得た分析と同じ配列番号2の配列をもつ人工ミスマッチプライマーを用いた。なお、配列番号4の配列に於いて、大文字で示す塩基がミスマッチ部位である。

t g t a a a c g a c g g c C a g : (配列番号4)

BAMPER法に本発明を適用した場合に得られる発光の信号強度は、従来のピロシーケンシング法により得られる発光の信号強度と比較して非常に高い。使用した試料量が0.5 fmolである場合、ピロシーケンシング法では、発光は検出できなかった。S/B(伸長鎖の形成に基づく信号/伸長鎖が形成されない場合のノイズ信号)が、BAMPER法で約13、ピロシーケンシング法で約1

4であるとき、それぞれの方法で得られる発光の信号強度比、即ち検出感度比は、およそ、2000:1である。

【0115】

このように、BAMPER法によるSNPs検出法に於いて本発明の前処理を適用した各試薬の使用により、従来のピロシーケンシング法に比べて2桁～3桁以上の高感度な検出が可能となる。従来のピロシーケンシング法、または通常のゲル電気泳動に基づくシーケンシングでは、pmolオーダーの試料が必要であるが、本発明を適用したBAMPER法に必要な1本鎖DNA試料の量は、50amol以下と非常に少ない。

【0116】

BAMPER法に於いてSNPs部位を検出するための、ワイルドタイプの1本鎖DNA試料に相補的なプライマーと、ミューテーションのある1本鎖DNA（ミュータント）試料に相補的なプライマーの2つを用意して、発現頻度分析を実行できる。

【0117】

図13は、本発明の実施例2に於ける従来のプライマーおよび人工ミスマッチプライマーをそれぞれ用いたSNPs発現頻度の測定での求めるべき発光強度、擬陽性の発光強度の比較例を示す図である。ここでは、1本鎖DNA試料としてp53遺伝子の一部を用いた場合のSNPsの検出結果例について説明する。

【0118】

ワイルドタイプの1本鎖DNAは配列番号5の配列をもつ。ワイルドタイプの1本鎖DNAに相補的なプライマーはprimer-Aであり、配列番号6の配列をもつ。ミュータントの1本鎖DNAは配列番号7の配列をもつ。ミュータントの1本鎖DNAに相補的なプライマーはprimer-Tであり、配列番号8の配列をもつ。本来、発光を生じないはずの通常のプライマー2種を、配列番号9の配列をもつprimer-C、配列番号10の配列をもつprimer-Gとする。なお、配列番号6から配列番号11の配列に於いて、大文字で示す塩基がミスマッチ部位である。

c t t t c t t g c g g a g a t t c t c t t c c t c t g t g c g c c

g g t c t c t c c c a g g a c a g g c a c A a a c a c g c a c c
t c a a a g c t g t t c c g t c c c a g t a g a t t a c c a : (配列番号5)

a a c a g c t t t g a g g t g c g t g A t t : (配列番号6)
c t t t c t t g c g g a g a t t c t c t t c c t c t g t g c g c c
g g t c t c t c c c a g g a c a g g c a c T a a c a c g c a c c t
c a a a g c t g t t c c g t c c c a g t a g a t t a c c a : (配列番号7)

a a c a g c t t t g a g g t g c g t g A t a : (配列番号8)

a a c a g c t t t g a g g t g c g t g A t g : (配列番号9)

a a c a g c t t t g a g g t g c g t g A t c : (配列番号10)

図13 (A) に示すように、本発明の前処理を実行しなかった場合または本発明のPPase、Apyraseを含む試薬キットを用いないで、且つ、通常のプライマーを使用した場合には、本来、発光しないはずのプライマーPrimer-C、primer-Gを用いたときですら、不純物による反応または擬似的なDNA鎖への核酸基質の取り込みにより生じる擬陽性の発光（擬陽性発光）1201がある。

【0119】

しかし、図13 (B) に示すように、本発明の前処理を実行し、または、本発明のPPase、Apyraseを含む試薬キットを用い、プライマーの3' 末端から3塩基目に人為的にDNA試料の塩基と相補でない核酸塩基が導入された人工ミスマッチプライマーを用いたBAMPER法では、擬陽性発光1202の発生を殆ど抑制できる。この結果、高感度検出が可能となる。

【0120】

試料がワイルドタイプとミュータントの2種のDNAを含んでいる場合、各々に相補的な2種のプライマー P_W および P_M を用いる相補鎖伸長反応で生成するPPiによる化学発光の強度 I_W および I_M は、ワイルドおよびミュータントDNAの存在率 A_W 、 A_M に比例する。即ち、2つの化学発光反応での発光の測定により、 I_W と I_M を計測して相対強度 $I_W / (I_W + I_M)$ 、および $I_M / ($

$I_W + I_M$) を求めると、ワイルドおよびミュータントの試料中の存在率 A_W 、および A_M を知ることができる。この存在率の測定は、使用する各試薬に含まれる不純物に起因する化学発光等に影響を受ける。しかし、図 1 3 に示すように、本発明の試薬キットの使用により、不純物に起因する化学発光が低減されているため、高い精度で存在率を計測できる。

【 0 1 2 1 】

本発明の実施例 2 に於ける p 5 3 遺伝子および人工ミスマッチプライマーを用いた S N P s 発現頻度の分析結果例を表 1 に示す。

【 0 1 2 2 】

【表 1】

表 1

存在率 [$A_M = I_M / (I_W + I_M)$]	発現頻度 [平均 ± 誤差]
0.020	0.019 ± 0.003
0.050	0.051 ± 0.008
0.100	0.096 ± 0.008
0.700	0.694 ± 0.010

【 0 1 2 3 】

図 1 4 は、本発明の実施例 2 に於ける人工ミスマッチプライマーを用いた B A M P E R 法による S N P s 発現頻度の分析結果例をグラフで示す図である。発現頻度の平均値は、0.6%以下の誤差で存在率 (S N P allele frequency) に一致し、1%以下の誤差で存在率が決定できる。

【 0 1 2 4 】

単純にタイピング (試料がワイルドタイプ、ミュータント、あるいは、ワイルドタイプとミュータントのヘテロ体であるか否かを決定するタイピング) を行なう場合は非常に簡単であり、ほぼ 1 0 0 % の正確さでタイピングを実行できる。

【 0 1 2 5 】

(実施例 3)

実施例 3 は 1 種類の試料 DNA に複数の 1 塩基変異 (SNPs) 部があり、複数の 1 塩基変異部を同一反応槽で順次分析する例である。

【0126】

図 15 は、本発明の実施例 3 に於ける同一 DNA または複数の DNA に存在する複数 SNPs を同一の反応槽で測定する方法の例を示す図である。実施例 3 では、実施例 2 と同様に、BAMPER 法で使用する人工ミスマッチプライマーを使用する。DNA 試料は、血液から DNA を抽出した後、必要な配列領域を PCR 等で増幅し、または特異的な DNA プローブ (SNPs 検出に使用するプライマーとは異なる) を DNA にハイブリダイズさせて相補鎖伸長反応により調整する。

【0127】

アビジンコートをした磁気ビーズ等の担体を用いて 1 本鎖 DNA を調整する場合には、ビオチン標識プライマーを用いて行うのが一般的である。その際、調整した DNA 試料溶液には増幅反応で用いた dNTPs や増幅反応で生じた PPi が含まれるので、これらを Apyrase や PPase 等の酵素により分解することで、化学発光反応に於けるノイズ信号を著しく低下させる。これら酵素が発光の計測を妨害する場合には、図 3 に示す方法、装置を用いて、反応溶液から分離して計測系外へ取り除く。

【0128】

1 本鎖 DNA 試料 1502 に、複数の SNPs 部位 a 1503、SNPs 部位 b 1504、SNPs 部位 c 1505 が存在するとき、同一 DNA を用いてこれらを分析することもできる。たとえば、標的 1 本鎖 DNA 試料 1502 の 3' 末端をビーズなどの担体 1501 に固定し、まず、1 本鎖 DNA 試料 1502 とプライマーの 3' 末端が SNPs 部位 b 1504 に一致する第 1 のプライマー 1506 を、1 本鎖 DNA 試料 1502 にハイブリダイズさせる。

【0129】

第 1 のプライマー 1506 の 3' 末端塩基が DNA 試料 1502 の SNPs 部位 b 1504 の塩基と相補的な場合のみ相補鎖伸長 1507 が形成され、大量の PPi 1508 が生じ、化学発光反応により大量に発光する。第 1 のプライマー

の3'末端塩基が1本鎖DNA試料1502の塩基と相補でない場合には、相補鎖伸長が起こらないので発光しない。この発光の有無により、ミューテーションの有無を判定する。

【0130】

第1のプライマー1506による発光の測定終了後、各試薬を洗い流し洗浄する。伸長して1本鎖DNA試料に結合した相補鎖は、溶液の温度を上昇させて解離させたり、液性をアルカリ性にしたり、あるいは、図10で説明したように、5'→3'エクソヌクレアーゼ反応により分解させて、1本鎖DNA試料を溶液内に再生させる。

【0131】

次に、1本鎖DNA試料1502とプライマーの3'末端塩基がSNPs部位a1503に一致する第2のプライマー1509をハイブリダイズさせ、伸長反応を行ない化学発光反応により生じる発光を測定する。1本鎖DNA試料1502による発光の測定終了後、上記と同様にして、1本鎖DNA試料のみを溶液に残す。

【0132】

さらに、同様にして、1本鎖DNA試料1502と第3のプライマー1510をハイブリダイズさせ、伸長反応を行ない化学発光反応により生じる発光を測定する。以下、同様の操作を、順次、繰り返す。

【0133】

また、PPaseがPPiは分解するがdNTPsは分解しないことを利用して、最初に第1のプライマーにより形成される伸長鎖を除去せずに、異なるSNPs部位を、順次、検出することも可能である。この場合は、図3に説明した方法、装置を用いて、必要に応じて、PPaseを反応溶液に導入したり、反応系の外部へ取り出したりする。この場合、第2、第3のプライマーの結合部位は同一のDNA鎖の上にあっても、異なるDNA鎖上であっても良いが、同一DNA鎖上にある場合には、第2のプライマーの方が第1のプライマーよりもDNA鎖の3'末端寄りにすることで、第1のプライマーにより形成されたDNA相補鎖を取り除きながら、相補鎖伸長が進行する様にできる。

【 0 1 3 4 】

このように、P P a s e を用いることにより、バックグラウンドを低減し、高感度で1本鎖DNA試料のS N P s 部位を検出できる。また、一度生成したP P i を、洗浄または分解により除去することで、同一の試料DNAを相補鎖伸長反応の鋳型（標的）として繰り返し使用できるので、1つのDNA試料で種々のS N P s 部位を調べることができる。従って、試料調製の手間が省け、効率の良い分析ができる。実施例3では、1種のDNAのみを用いて説明したが、複数種のDNA試料を同時に用いても、同様に容易に分析できる。

【 0 1 3 5 】

上述の洗浄の実行を省略して測定することもできる。この場合、発光を検出した後、反応系を計測部から取り出して、P P a s e によりP P i が十分に分解されるまで、数分間放置するか、P P a s e を多量に加えてP P i が速やかに分解されるようにし、発光の持続時間が短くなるようにして計測上問題が無い様にする。この測定では、発光強度が十分弱くなってから第2のプライマーを入れて相補鎖伸長反応を行なう。反応溶液には、d N T P s およびDNAポリメラーゼが存在するので、相補鎖伸長は支障無く行われる。再び、多量のP P i が生成し、化学発光反応により発光が生ずるので、計測部に反応系を導入して、化学発光を計測することになる。

【 0 1 3 6 】

以上、本発明における核酸塩基配列解析方法の実施例においてP P a s e およびA p y r a s e であらかじめ処理した試薬溶液を用いる有用性を示した。P P a s e、A p y r a s e 等の酵素は作用温度内で活性を表すが、使用試薬にP P a s e 処理を施す場合、その添加量（濃度）は十分に夾雑P P i を分解し、且つ信号検出に影響しない範囲で設定されていることが重要である。一方、適切な範囲で添加量が設定されていれば、P P a s e が残存していても本来の計測に支障はない。

【 0 1 3 7 】

図16は、本発明の実施例1に於ける、ピロシーケンシング法における添加されたP P a s e の残存量の違いに基づく信号強度の比較を示す図である。信号測

定は表 2 に示す条件とした。

【 0 1 3 8 】

【表 2】

表 2

核酸試料量	0.2 pmol (2.5 μ M)
PPase処理温度	室温
PPase処理時間	30分
光検出器	光電子増倍管
ゲイン	10 ⁶ 倍
引加電圧	10 ³ V
信号増幅率	10 ⁶ 倍

【 0 1 3 9 】

試料には配列番号 1 1 に示す p 5 3 の一部の 1 本鎖 DNA を用いた。

g t g g t a a t c t a c t g g g a c g g a a c a g c t t t g a g g
t g c g t g t t t g t g c c t g t c c t g g g a g a g a c c (配
列番号 1 1)

プライマーは試料 DNA と完全に相補的な配列番号 1 2 の配列を持つ伸長プライマーを用い、試料 DNA 中に下線を施した 3 塩基 t t t の信号強度を比較した。

g g t c t c t c c c a g g a c a g g c a (配列番号 1 2)

図 1 6 においては、伸張が無い条件での P P a s e 処理を施した場合のノイズ信号 (a) をコントロールとし伸張があるときの発光強度信号 (b) を、残存量をパラメータとして比較して示したものである。

【 0 1 4 0 】

本測定では、伸長が起こる条件で観測される信号 (S) 強度がノイズ信号 (N) の 1. 2 5 倍以上であれば ($S/N = 1. 2 5$)、伸長に基づく発光による信号として検出できる。図から分かるように、0. 2 U/L の P P a s e (1 6 0

1) であらかじめ反応溶液を処理すれば核酸の塩基配列解析は行える。しかし、まだノイズ信号のレベルは高く、高感度検出は出来ない。ノイズ信号が観測されなくなるまで十分量の P P a s e を作用させた方が良い。ところが、たとえば、5.0 U/L の P P a s e (1603) であらかじめ反応溶液を処理すると、ノイズ信号はほぼ観測されなくなるが、同時に伸長に基づく信号も減少する。これは P P i の分解速度が速まり、伸長に基づいて放出された P P i を発光反応前に分解してしまうからで、結果として、核酸試料は相補鎖伸長しているにも関わらず発光は検出されにくくなり、この場合も高感度検出は出来ない。図には示さなかったが、残存量が 20 U/L 以上となるほど P P a s e を添加すると発光信号は全く検出されなかった。たとえば、5.0 U/L の P P a s e 処理を施し、これを完全に除去した後に発光測定を行なう方法 (1604) が最も良好な S/N を与え、高感度検出を可能にすることが分かる。しかし、計測に必要な十分な分解能での S/N を持つという点では、0.8 U/L の P P a s e (1602) を添加したのみの場合と大きな違いはない。

【0141】

このことは、本発明では、事前の P P a s e 処理は不可欠であり、最適な添加量を選択すれば、除去しなくても、また、大過剰の P P a s e で処理しても、伸張、測定に先んじてこれを除去すれば、十分にノイズ信号を減少させ、かつ、十分な強度の発光強度信号を得ることができることを意味している。これにより高感度検出が可能になる。

【0142】

A p y r a s e は d N T P s およびその類似体を含む溶液以外の試薬溶液に加えるが、これについても同じことが言える。

【0143】

図 17 に、本発明の P P a s e および A p y r a s e を用いた反応試薬の処理工程を有する核酸塩基配列自動解析装置の一例を示す。(A) は全体の構成図を、(B) - (D) は試薬から夾雑の P P i あるいは A T P を除去するための除去部の具体例を示す。図の実施例によれば、多数の試料を同時に解析すること、試薬注入、試料注入、検出などの測定に要する諸操作のオンライン自動化により、

核酸塩基配列解析のスループットを向上させることが可能となる。図において、1801は数 μL 以下の容積の反応槽であり、1802は解析チップである。反応槽1801は解析チップ1802上に同心円上に多数配列される。解析チップ1802の形状は本例のようにCD型でもスクエアシート型でも良い。1803は試薬ディスペンサーであり、プライマー、相補鎖伸長反応に必要な諸試薬、発光反応に必要な諸試薬を反応槽1801に供給する。1805は試薬から夾雑のPPiあるいはATPを除去するための除去部である。

【0144】

すなわち、本発明では、測定に先行して、試薬をPPaseあるいはApyraseで処理するわけであるが、試薬ディスペンサー1803から試料に試薬を供給する前段階に、試薬から夾雑のPPiあるいはATPを除去するための除去部1805を配置する。(B)に示す除去部1805は、フィルター1806とフィルターホルダー1807からなる例である。ビーズ等の固体に固定したPPaseあるいはApyraseが入れてある試薬を用いる場合には、これらはフィルター1806により試薬から除去される。フィルター1806の素材はポリスチレンなどの高分子シートでも多孔質ガラスでも良いが、 $\phi 1\sim 2\text{ cm}$ 、孔径 $\phi 0.2\sim 1.4\ \mu\text{m}$ 程度のものを用い、ここに酵素固定の $\phi 3\ \mu\text{m}$ 程度のビーズを含む溶液を流速 2 mL/分 程度で流す。フィルタホルダーの大きさは処理する試薬量により適宜選べ、全長が $1\sim 5\text{ cm}$ 程度である。ここで、図3(c)に説明したように、フィルターの代わりに $\text{NWML}=10,000$ 程度の分子量選択透過膜を用いれば、PPase分子、Apyrase分子を直接除去することもできる。(C)に示す除去部1805は、内部にPPase固定のビーズ1808およびApyrase固定のビーズ1809を詰めたカラム1810とした例である。測定条件に応じて未処理の試薬を用意した場合にも溶液がカラム1810を通過する過程で処理が施され、夾雑PPiおよび夾雑ATPは測定前に自動的に除去される。(D)に示す除去部1805は、カラム内部に直接成長させた多孔質1811に直接PPaseやApyraseが固定されているカラム1812とした例である。カラム1812にはポリスチレン、溶融シリカ、ガラスなどを素材とする粒径 $\phi 3\ \mu\text{m}$ 程度のビーズを詰める。カラム全体の体積は $5\sim$

10 mL程度とし、流速は処理したい溶液に合わせて適宜選択し、作用時間を調節する。例えば体積10 mLのカラムを用い、カラム中の全PPase量を30 mU程度（U：活性単位、ユニット）にしておけば、0.5 mL/分程度の流速で試薬溶液を通過させれば夾雑PPIを分解・除去するのに十分である。なお、除去部1805は、いずれの場合でも、フィルターホルダー1807を備えて、その中をフィルターあるいはカラムを着脱・交換するものとするのが便利である。

【0145】

試薬溶液の送液は、いずれにおいても、シリンジや圧電素子を用いて直接液体を押し出し（ポンピング）ても、圧縮ガスを介して間接的に押ししても良い。あるいはディスペンサー1803側を負圧にして引いても良い。

【0146】

本実施例では、（1）異なる複数の核酸試料の塩基配列解析、（2）異なる複数の核酸試料のある特定個所の一塩基多型部の解析、あるいは（3）一種の核酸試料における複数の一塩基多型部などを同時に解析することができる。（1）の場合は個々の反応槽に核酸試料を入れておき、1種のプライマー、相補鎖伸長反応に必要な諸試薬、発光反応に必要な諸試薬をから同時に供給し、4種の核酸基質（dNTP：N=A、T、G、C）あるいはその類似体は順次供給する。（2）の場合には4種の核酸基質の混合溶液を試薬ディスペンサー1803から同時に供給する。（3）の場合は個々の反応槽に同一の核酸試料を入れておき、複数種のプライマーを順次加えても、個々の反応槽に各々異なる核酸試料を入れておき複数種のプライマーを順次加えても良い。いずれの場合も個々の反応槽からの相補鎖伸長に伴う生物発光をフォトセンサー1804で検出することで核酸塩基の配列解析を行う。

【0147】

【発明の効果】

本発明の核酸塩基配列解析法および試薬キットおよび核酸塩基配列解析装置によれば、高感度で短時間にDNA試料のSNPsの有無を検出できる。また、本発明の前処理、または試薬キットを使用して、本発明の核酸塩基配列解析方法

で使用される試薬に含まれる不純物、または核酸基質が熱分解して生成する無機ピロリン酸 (P P i) 等の不純物を分解し除去して、S N P s の存在比の測定を、高い信頼度、高い精度で実行可能にする。更に、本発明の核酸塩基配列解析方法では、短時間で多数の試料を測定できる、高速高スループットのDNA検査システムを実現できる。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> HITACHI, LTD.

<120> Method of DNA Sequencing, Reagent Kit for DNA Sequencing and Apparatus for DNA Sequencing

<130> NT01P0333

<160> 12

<210> 1

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Template DNA originating from M13mp18

<400> 1

acaggaaaca gctatgacca tgattacgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcctctaga 60

gtcgacctgc aggcatgcaa gcttggcact ggccgtcggtt ttaca 105

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer complementary with base sequence between 88 and 105 of SEQ ID NO:1, but the base replaced C at 15 of this DNA primer by G for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA, and DNA prime

r being able to be extended

<400> 2

tgtaaaacga cggcgag 17

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> DNA primer complementary with base sequence between 88 and 105 of SEQ ID NO:1, but the base replaced C at 15 of this DNA primer by G for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA, and DNA primer being not able to be extended

<400> 3

tgtaaaacga cggcgat 17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> DNA primer complementary with base sequence between 88 and 105 of SEQ ID NO:1, and DNA primer being able to be extended

<400> 4

tgtaaaacga cggccag 17

<210> 5

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Template DNA originating from p53 and including base sequence of exon 8

<400> 5

ctttcttgcg gagattctct tcctctgtgc gccggtctct cccaggacag gcacaaacac 60
gcacctcaaa gctgttccgt cccagtagat tacca 95

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer complementary with base sequence between 55 and 76 of S
EQ ID NO:5, but the base replaced T at 19 of this DNA primer by A for i
ntroducing a mismatch between DNA primer and template DNA, and DNA prime
r being able to be extended

<400> 6

aacagctttg aggtgcgtga tt 22

<210> 7

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Template DNA originating from p53 and including base sequence of e
xon 8, but the base replaced A at 55 of this template DNA by T

<400> 7

ctttcttgcg gagattctct tcctctgtgc gccggtctct cccaggacag gcactaacac 60
gcacctcaaa gctgttccgt cccagtagat tacca 95

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer complementary with base sequence between 55 and 76 of S

EQ ID NO:7, but the base replaced T at 19 of this DNA primer by A for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA, and DNA primer being able to be extended

<400> 8

aacagctttg aggtgcgtga ta 22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer complementary with base sequence between 55 and 76 of S EQ ID NO:5 and 7, but the base replaced T at 19 of this DNA primer by A for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA, and this DNA primer being not able to be extended

<400> 9

aacagctttg aggtgcgtga tc 22

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer complementary with base sequence between 55 and 76 of S EQ ID NO:5 and 7, but the base replaced T at 19 of this DNA primer by A for introducing a mismatch between DNA primer and template DNA, and this DNA primer being not able to be extended

<400> 10

aacagctttg aggtgcgtga tg 22

<210> 11

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Template DNA originating from p53 and including base sequence of exon 8

<400> 11

gtggtaatct actgggacgg aacagctttg aggtgcgtgt ttgtgcctgt cctgggagag 60
acc 63

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> DNA primer complementary with base sequence between 44 and 63 of SEQ ID NO:11, and DNA primer being able to be extended

<400> 12

ggtctctccc aggacaggca 20

配列表フリーテキスト

(1) 配列番号1の配列に関する他の情報の記載

M13mp18遺伝子由来のサンプル1本鎖DNA。

(2) 配列番号2の配列に関する他の情報

配列番号1の配列の5'末端から88番目から105番目の部分に相補鎖結合し、17塩基長を持つプライマーで、5'末端から15番目の塩基Cを塩基Gに置き換えミスマッチを導入した相補鎖伸長能力のあるDNA伸長プライマー。

(3) 配列番号3の配列に関する他の情報

配列番号1の配列の5'末端から88番目から105番目の部分に相補鎖結合し、17塩基長を持つプライマーで、5'末端から15番目の塩基Cを塩基Gに置き換えミスマッチを導入した相補鎖伸長能力のないDNA伸長プライマー。

(4) 配列番号4の配列に関する他の情報

配列番号1の配列の5'末端から88番目から105番目の部分に相補鎖結合し

、17塩基長を持つプライマーで、相補鎖伸長能力のあるDNA伸長プライマー。

(5) 配列番号5の配列に関する他の情報

P53遺伝子由来の1本鎖DNAであり、エクソン8の配列を含むサンプル1本鎖DNA。

(6) 配列番号6の配列に関する他の情報

配列番号5の配列の5'末端から55番目から76番目の部分に相補鎖結合し、22塩基長を持つプライマーで、5'末端から19番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入した相補鎖伸長能力のあるDNA伸長プライマー。

(7) 配列番号7の配列に関する他の情報

P53遺伝子由来の1本鎖DNAであり、5'末端から55番目の塩基Aを塩基Tに置き換えたサンプル1本鎖DNA。

(8) 配列番号8の配列に関する他の情報

配列番号7の配列の5'末端から55番目から76番目の部分に相補鎖結合し、22塩基長を持つプライマーで、5'末端から19番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入した相補鎖伸長能力のあるDNA伸長プライマー。

(9) 配列番号9の配列に関する他の情報

配列番号5および配列番号7の配列の5'末端から55番目から76番目の部分に相補鎖結合し、22塩基長を持つプライマーで、5'末端から19番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入した相補鎖伸長能力のないDNA伸長プライマー。

(10) 配列番号10の配列に関する他の情報

配列番号5および配列番号7の配列の5'末端から55番目から76番目の部分に相補鎖結合し、22塩基長を持つプライマーで、5'末端から19番目の塩基Tを塩基Aに置き換えミスマッチを導入した相補鎖伸長能力のないDNA伸長プライマー。

(11) 配列番号11の配列に関する他の情報

P53遺伝子由来の1本鎖DNAであり、エクソン8の配列を含むサンプル1本鎖DNA。

(1 2) 配列番号 1 2 の配列に関する他の情報

配列番号 1 1 の配列の 5' 末端から 4 4 番目から 6 3 番目の部分に相補鎖結合し、2 0 塩基長を持つプライマーで、相補鎖伸長能力のある DNA 伸長プライマー

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施例 1 に於ける相補鎖伸長により生成する P P i を化学発光反応により検出する核酸塩基配列解析方法での、ノイズを低減するための試料溶液調整法を説明するフロー図。

【図 2】

本発明の実施例 1 に於ける、プライマーの 1 塩基伸長により生じる P P i を化学発光反応により検出する原理を説明する図。

【図 3】

(A) , (B) および (C) は本発明の実施例 1 に於ける、試薬や DNA 試料に含まれる不純物の分解を、固相または膜を用いてピロフォスファターゼおよびアピラーゼにより行う前処理法の例、前処理装置の例を説明する図。

【図 4】

本発明の実施例 1 に於ける、P P a s e による前処理の有無によるノイズ信号の比較例を示す図。

【図 5】

本発明の実施例 1 に於ける P P a s e による前処理によるノイズ信号の d C T P の濃度依存性の例を示す図。

【図 6】

本発明の実施例 1 に於ける、ピロシーケンシングを実行する核酸塩基配列解析装置の構成例を示す模式図。

【図 7】

本発明の実施例 1 に於ける、ピロシーケンシング法による伸長鎖の検出例を説明する図。

【図 8】

本発明の実施例 2 に於ける、プライマー伸長法による S N P s 発現頻度の計測方法の例の原理を説明する模式図。

【図 9】

本発明の実施例 2 に於ける人工ミスマッチプライマーを用いたプライマー伸長法による S N P s 発現頻度の高感度な計測方法の例の原理を説明する図。

【図 1 0】

本発明の実施例 2 に於ける人工ミスマッチプライマーおよび 5' → 3' エクソヌクレアーゼを用いたプライマー伸長法による S N P s 発現頻度の高感度な計測方法の例の原理を説明する図

【図 1 1】

本発明の実施例 2 に於ける、人工ミスマッチプライマーを用いたプライマー伸長法による S N P s 検出での、P P a s e による前処理の効果の一例を示す図。

【図 1 2】

本発明の実施例 2 に於ける人工ミスマッチプライマーを用いたプライマー伸長法による S N P s 検出とピロシーケンシング法による S N P s 検出の感度の比較例を示す図。

【図 1 3】

本発明の実施例 2 に於ける従来のプライマーおよび人工ミスマッチプライマーをそれぞれ用いた S N P s 発現頻度の測定での求めるべき発光強度、擬陽性の発光強度の比較例を示す図。

【図 1 4】

本発明の実施例 2 に於ける人工ミスマッチプライマーを用いた S N P s 発現頻度の分析結果例をグラフで示す図。

【図 1 5】

本発明の実施例 3 に於ける同一 DNA または複数の DNA に存在する複数 S N P s を同一の反応槽で測定する方法の例を示す図。

【図 1 6】

本発明の実施例 1 に於ける、ピロシーケンシング法における添加された P P a s e の添加量の違いと、P P a s e 除去操作の有無に基づく信号強度の比較を示

す図。

【図17】

本発明に於ける、PPi、dNTPsおよびATP除去機構を備えた核酸塩基配列およびSNPs自動解析装置を示す図。

本発明のPPaseおよびApyraseを用いた反応試薬の処理工程を有する核酸塩基配列自動解析装置の一例を示す図であり、(1)は全体の構成図を、(B) - (D)は試薬から夾雑のPPiあるいはATPを除去するための除去部の具体例を示す。

【符号の説明】

101:被験者から採取した血液、102:抽出した2本鎖DNA、103:PCR(Polymerase Chain Reaction)、107:アピラーゼ(Apyrase)および/またはピロフォスファターゼ(PPase)、108:相補鎖伸長および化学発光に用いる混合溶液、109:dNTPsを含む溶液、110:前処理を施したdNTPsを含む溶液、112:相補鎖伸長反応、113:化学発光、114:発光検出118:伸長したプライマーがハイブリダイズした標的1本鎖DNA、104, 201, 701, 801, 802, 901, 902, 1502:1本鎖DNA試料、117, 202, 702:プライマー、203:核酸基質(dNTPs:dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP)、204:DNAポリメラーゼ、205, 206, 216, 707, 712:PPi、207:APS、208:ATPスルフリラーゼ、209, 211:ATP、210:硫酸イオン、212:ルシフェリン、213:酸素、214:ルシフェラーゼ、215:AMP、217:オキシルシフェリン、218:二酸化炭素、219:発光(1光子放出)、105, 301:Apyrase、106, 302:PPase、303:前処理を施していない試薬またはDNA試料、304:試薬またはDNA試料中の不純物の核酸基質(dNTPs:dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP)、305:試薬またはDNA試料中の不純物のATP、306:試薬またはDNA試料中の不純物のPPi、307:前処理済みの溶液、308:デオキシヌクレオシドーリン酸(dNMP)、309:アデニル酸(AMP)、310:ATP, PPiおよび核酸基質の分

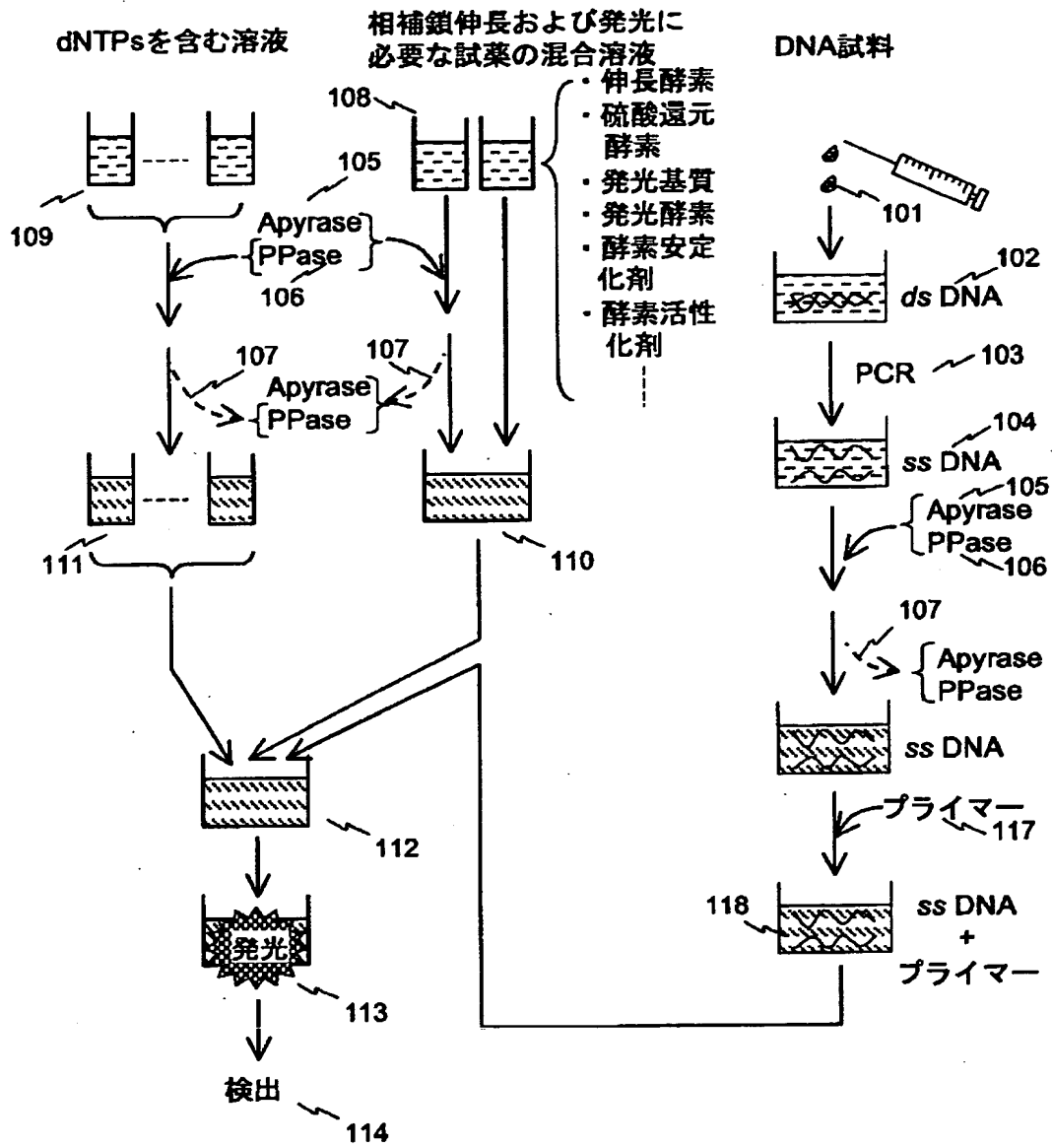
解で生ずる PPi 、311, 312 : ビーズなどの固相表面、313 : 細管内壁
 などの固相表面、314 : 分子量選択透過膜、601 : 反応槽、602 : ホトセ
 ンサー、603 : 増幅器、604 : ローパスフィルター、605 : データ処理装
 置、703, 710 : $dATP\alpha S$ 、704 : $dCTP$ 、705 : $dTTP$ 、7
 06, 711 : 1塩基伸長反応、707, 712 : 1塩基伸長に伴い放出された
 PPi 、708, 713 : 化学発光、709 : $dGTP$ 、803, 805 : プラ
 イマーの3'末端、804 : プライマー、806, 907 : 相補鎖伸長反応によ
 る伸長、807, 908, 1508 : 大量の PPi 、808, 909 : 大量の P
 Pi に基づく強い発光、809 : 僅かな相補鎖伸長、810 : 極微量の PPi 、
 811 : 極微量の PPi に基づく微弱な発光、903, 911 : 人工ミスマッチ
 プライマーの3'末端の塩基、904 : 人工ミスマッチプライマーの3'末端か
 ら3塩基目の塩基、905 : 人工ミスマッチプライマー、906 : 人工ミスマッ
 チプライマーの3'末端の塩基が1本鎖DNA試料の塩基と相補である状態、9
 10 : 人工ミスマッチプライマーの3'末端の塩基が1本鎖DNA試料の塩基に
 相補でない状態、912 : 伸長反応が起こらない状態、913 : PPi が殆ど生
 じない状態、914 : 発光が殆ど無い状態、1010 : m 回の繰り返し伸張反応
 で生じた $m \times n$ 個の PPi 、1201, 1202 : 擬陽性発光、1501 : ビー
 ズなどの固相表面、1503, 1504, 1505 : 同一DNA鎖上の異なる S
 NPs 部位、1506 : SNP s 部位 b 用に設計した人工ミスマッチプライマー
 、1509 : SNP s 部位 a 用に設計した人工ミスマッチプライマー、1601
 : 0.2 U/L の $PPase$ で処理 (発光測定時の $PPase$ 除去無) した場合
 の発光信号、1602 : 0.8 U/L の $PPase$ で処理 (発光測定時の PPa
 se 除去無) した場合の発光信号、1603 : 5.0 U/L の $PPase$ で処理
 (発光測定時の $PPase$ 除去無) した場合の発光信号、1604 : 5.0 U/
 L の $PPase$ で処理 (発光測定時の $PPase$ 除去有) した場合の発光信号、
 1801 : 伸長および発光反応用反応槽、1802 : 核酸塩基配列自動解析装置
 、1803 : 試薬ディスペンサー、1804 : 発光測定用フォトセンサー、18
 05 : PPi および/または ATP 除去用ユニット、1806 : $PPase$ およ
 び/または $Apyrase$ 保持担体分離用フィルター、1807 : フィルターホ

ルダー、1808:PPase固定ビーズ、1809:Apyrase固定ビーズ、1810:カラム、1811:多孔質担体、1812:PPaseおよび／またはApyrase固定カラム。

【書類名】 図面

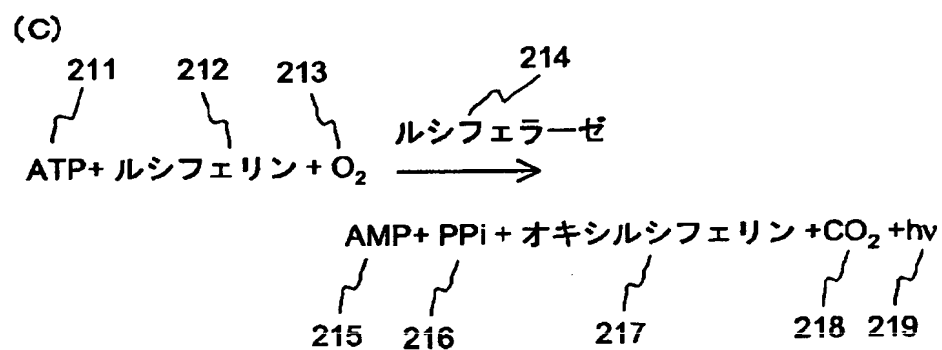
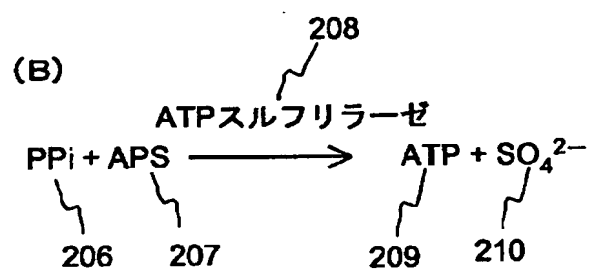
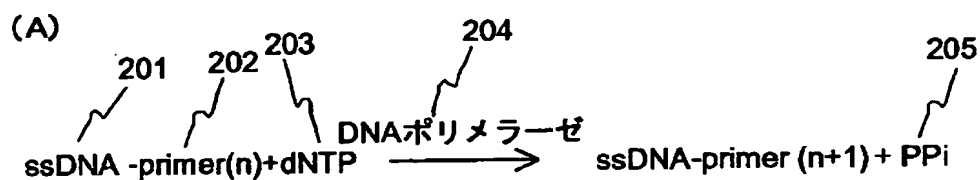
【図 1】

図 1



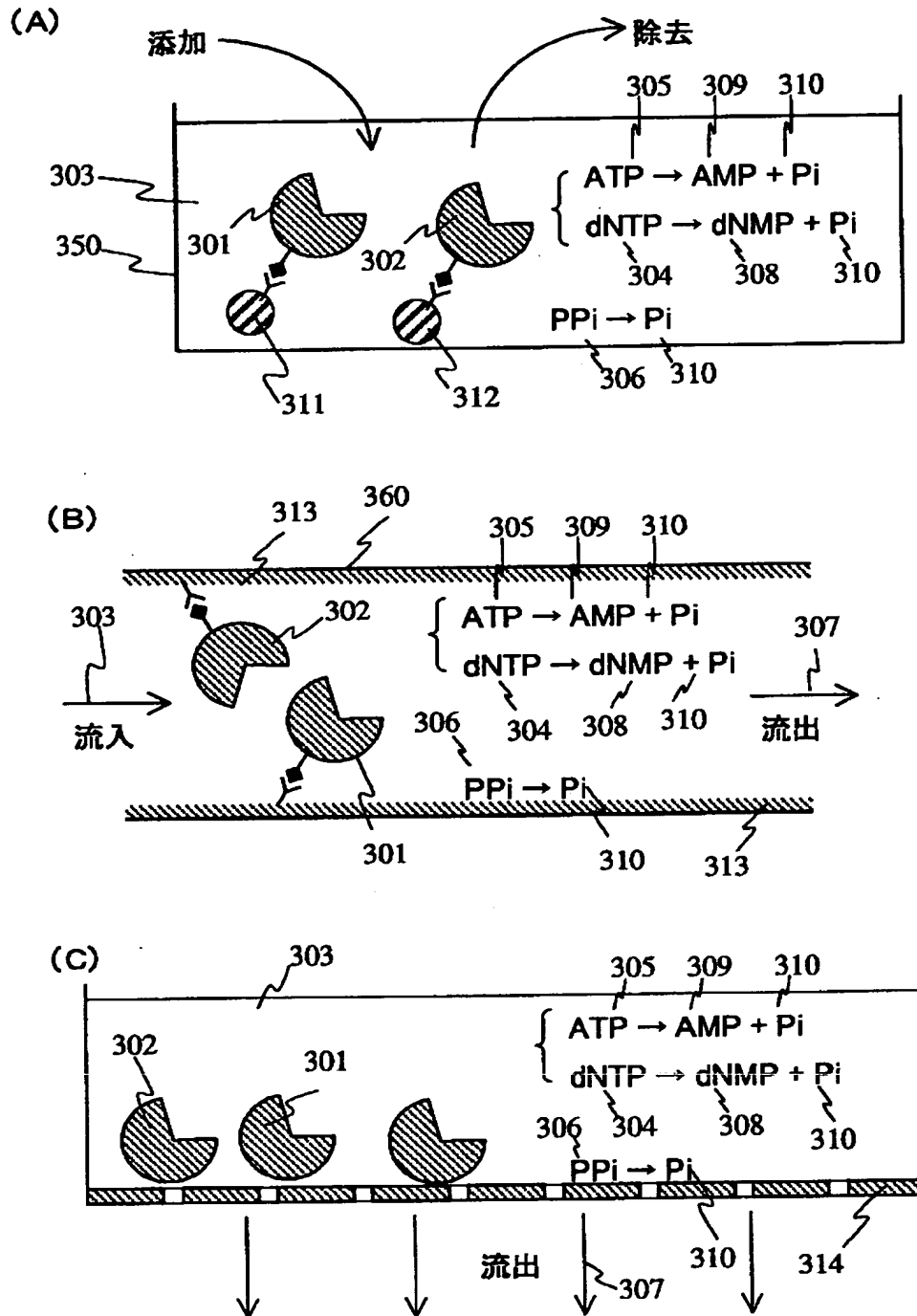
【図 2】

図 2



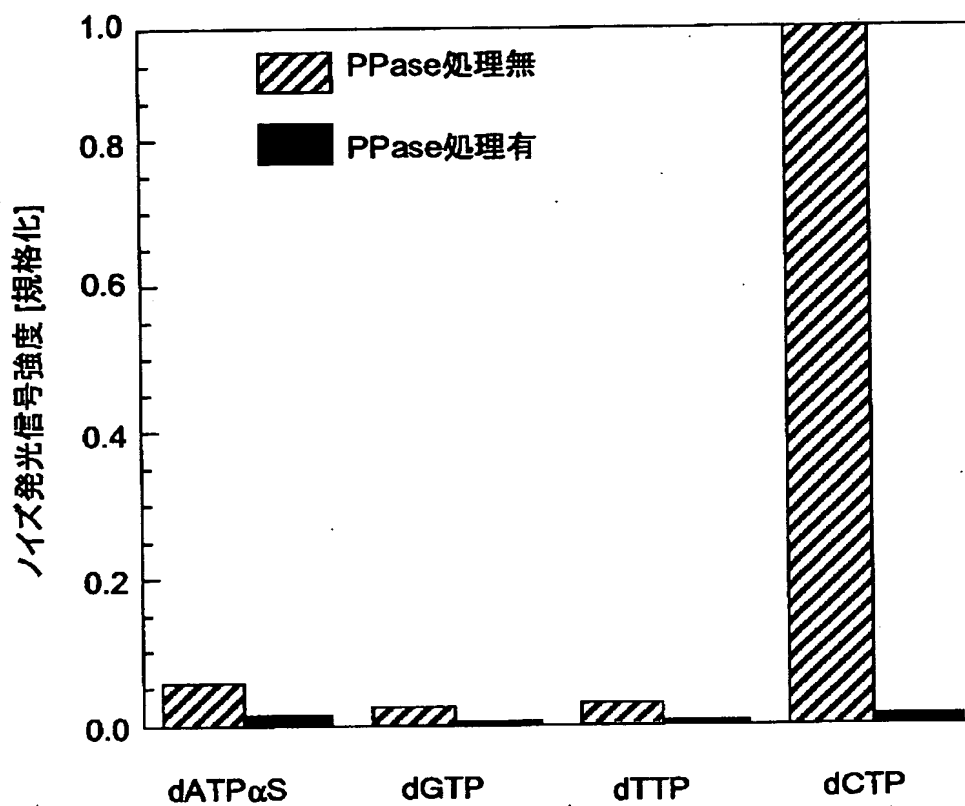
【图 3】

图 3



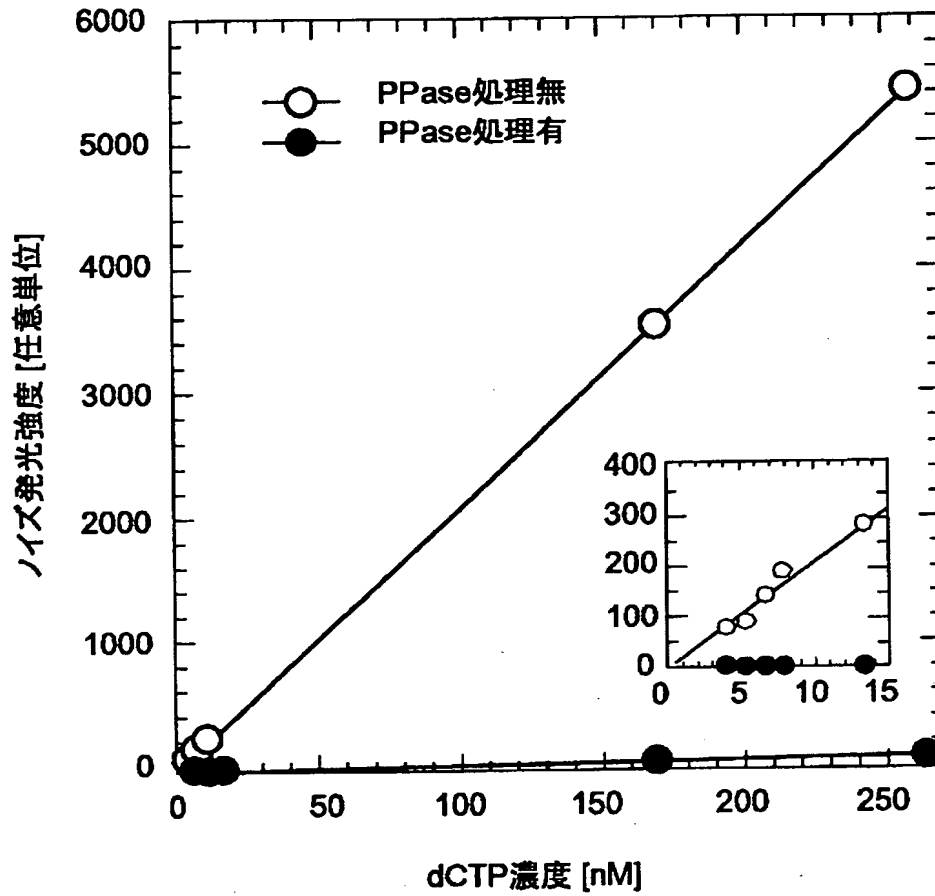
【図 4】

図 4



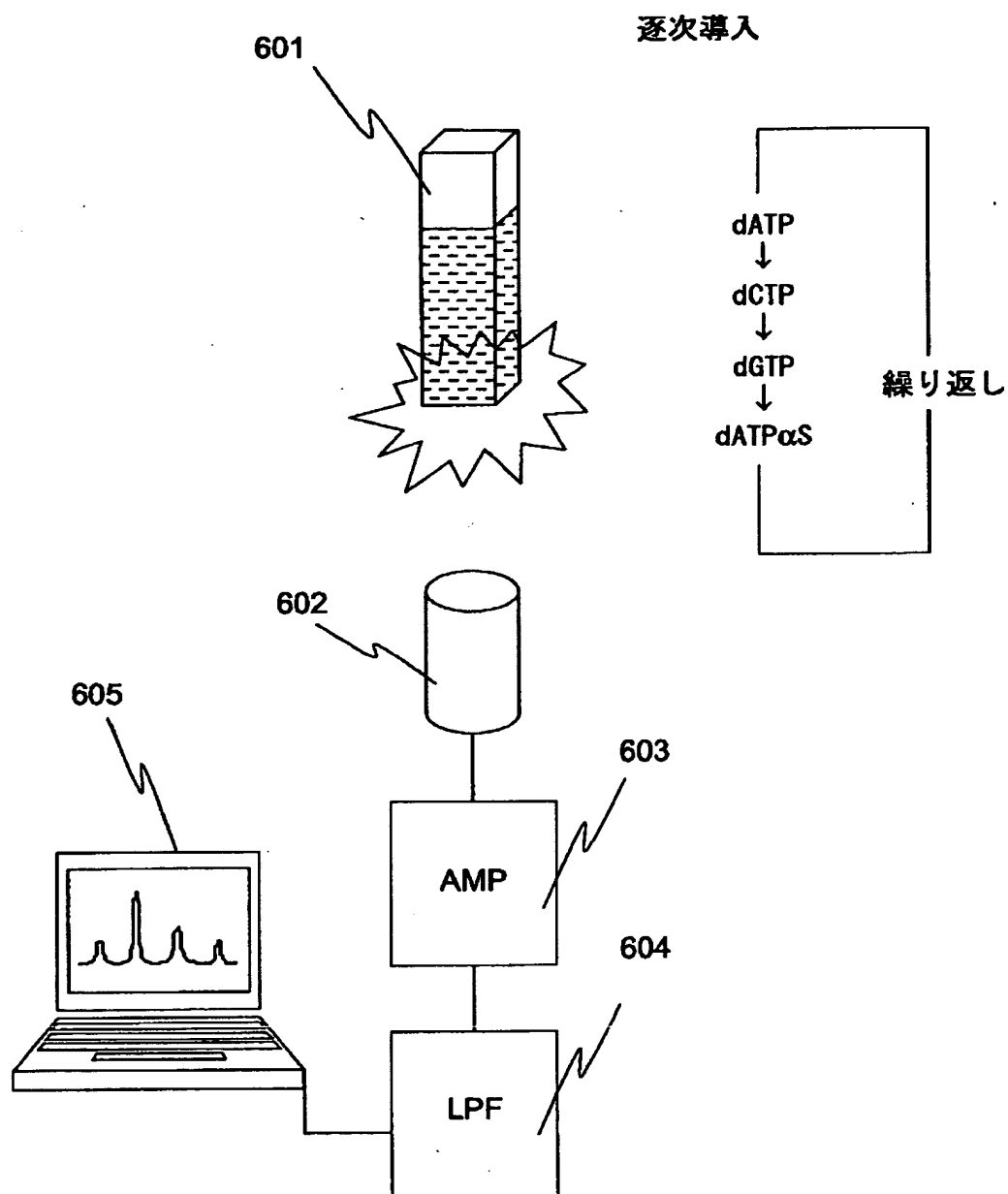
【図 5】

図 5



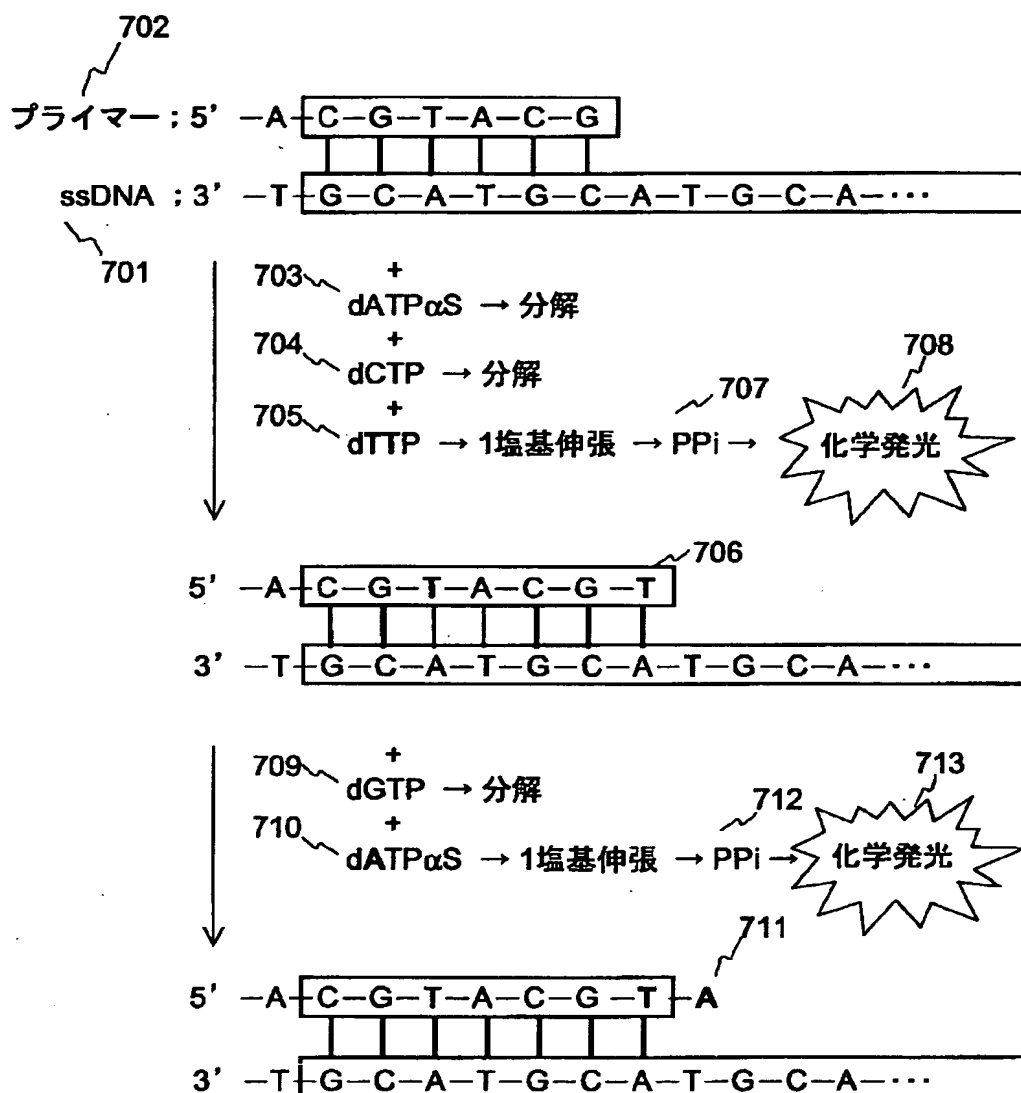
【図 6】

図 6



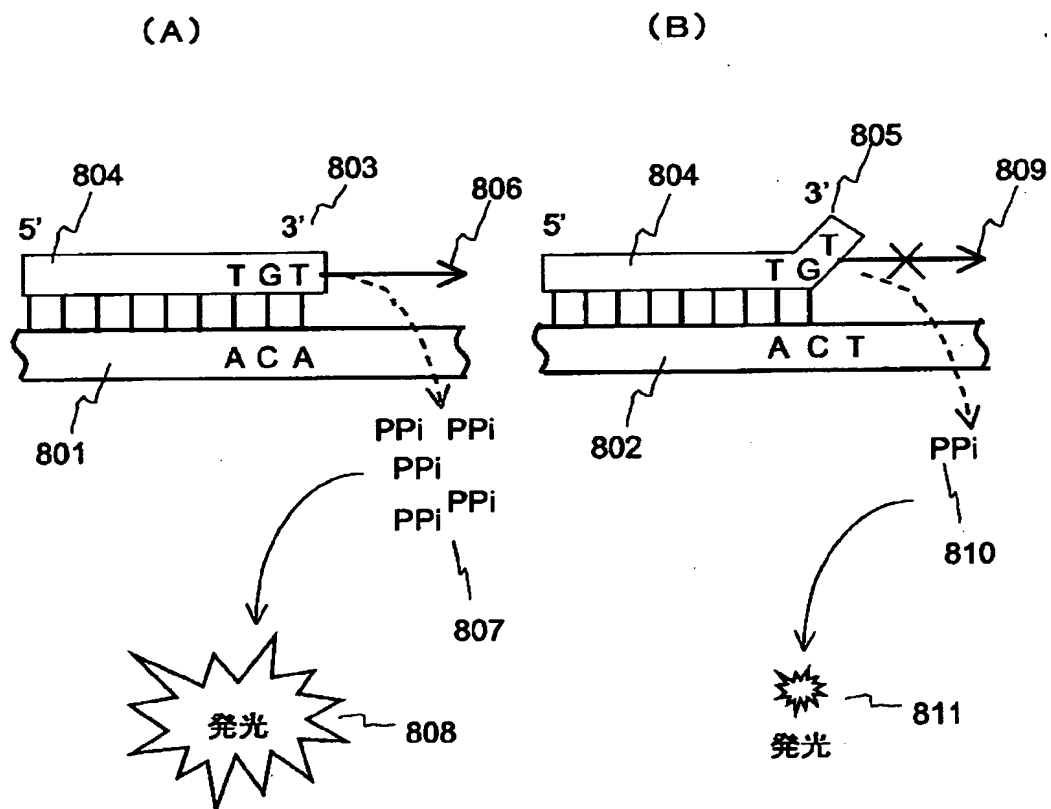
【図 7】

図 7



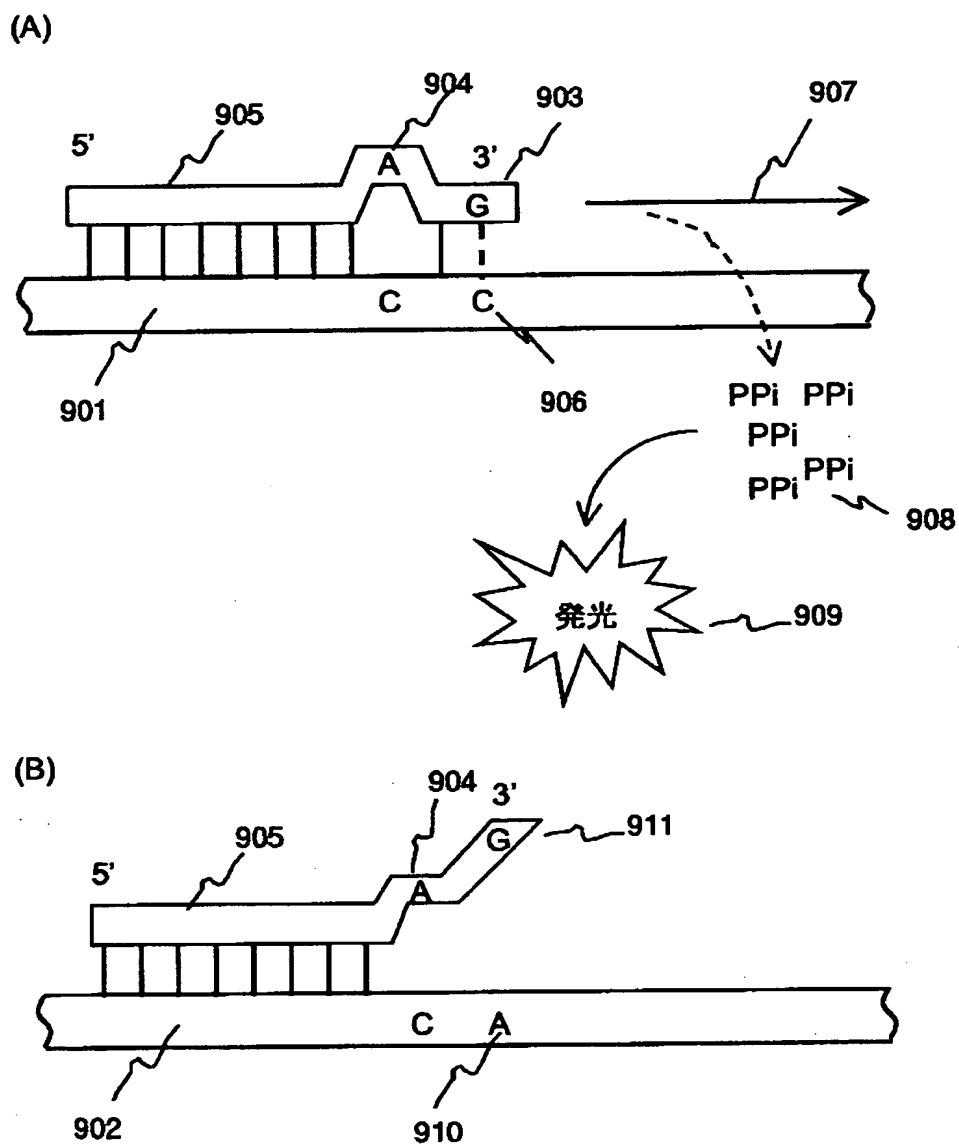
【図 8】

図 8



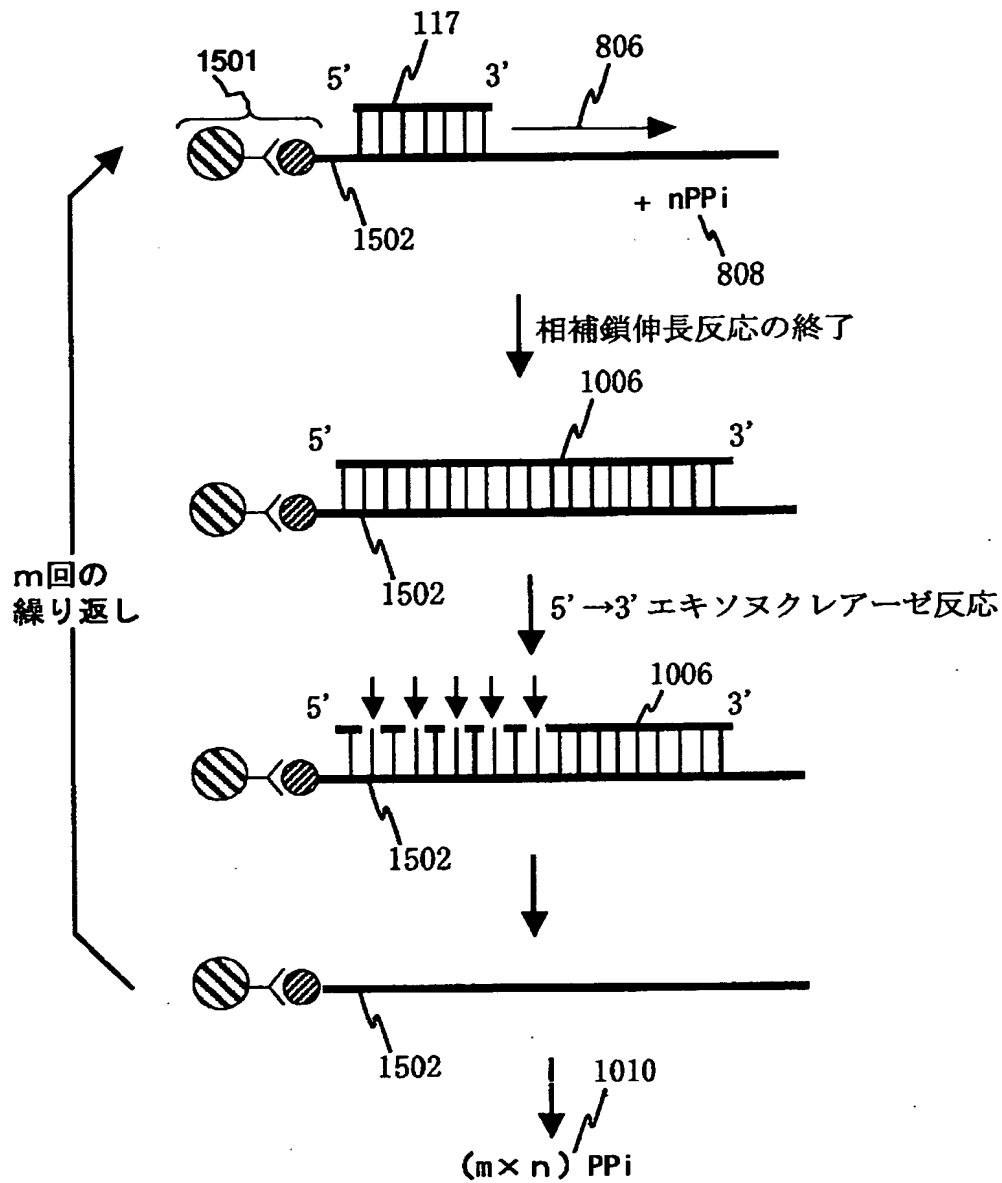
【図 9】

図 9



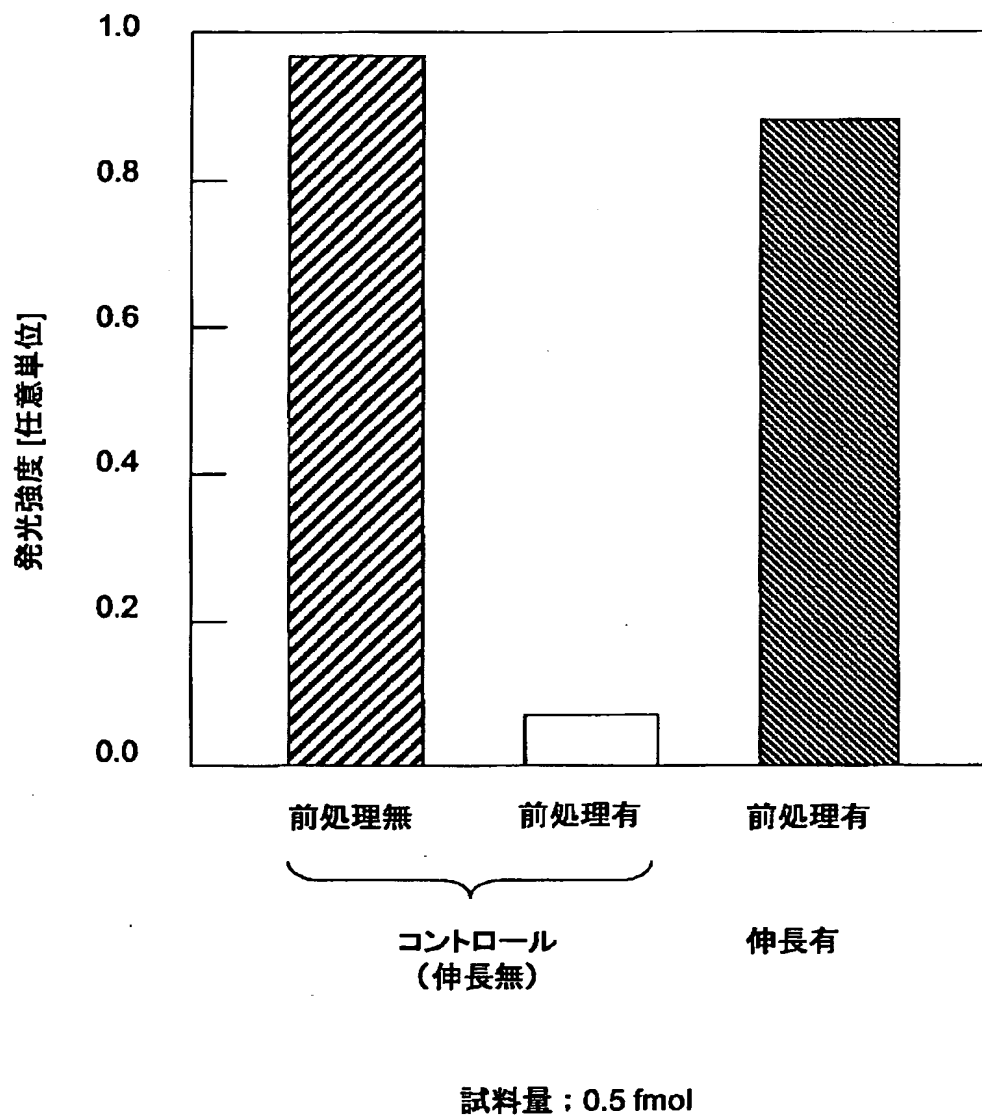
【図10】

図 10

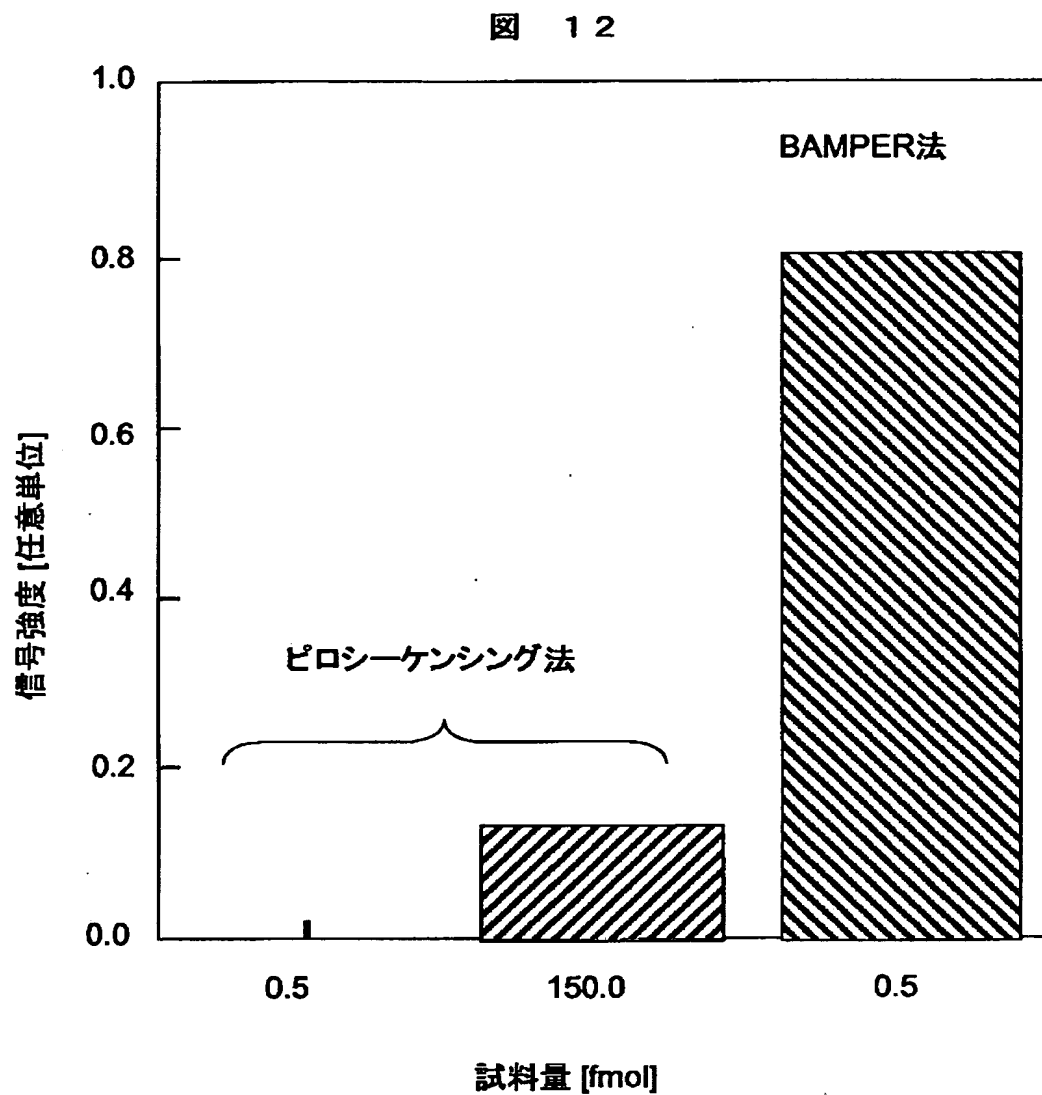


【図 11】

図 11

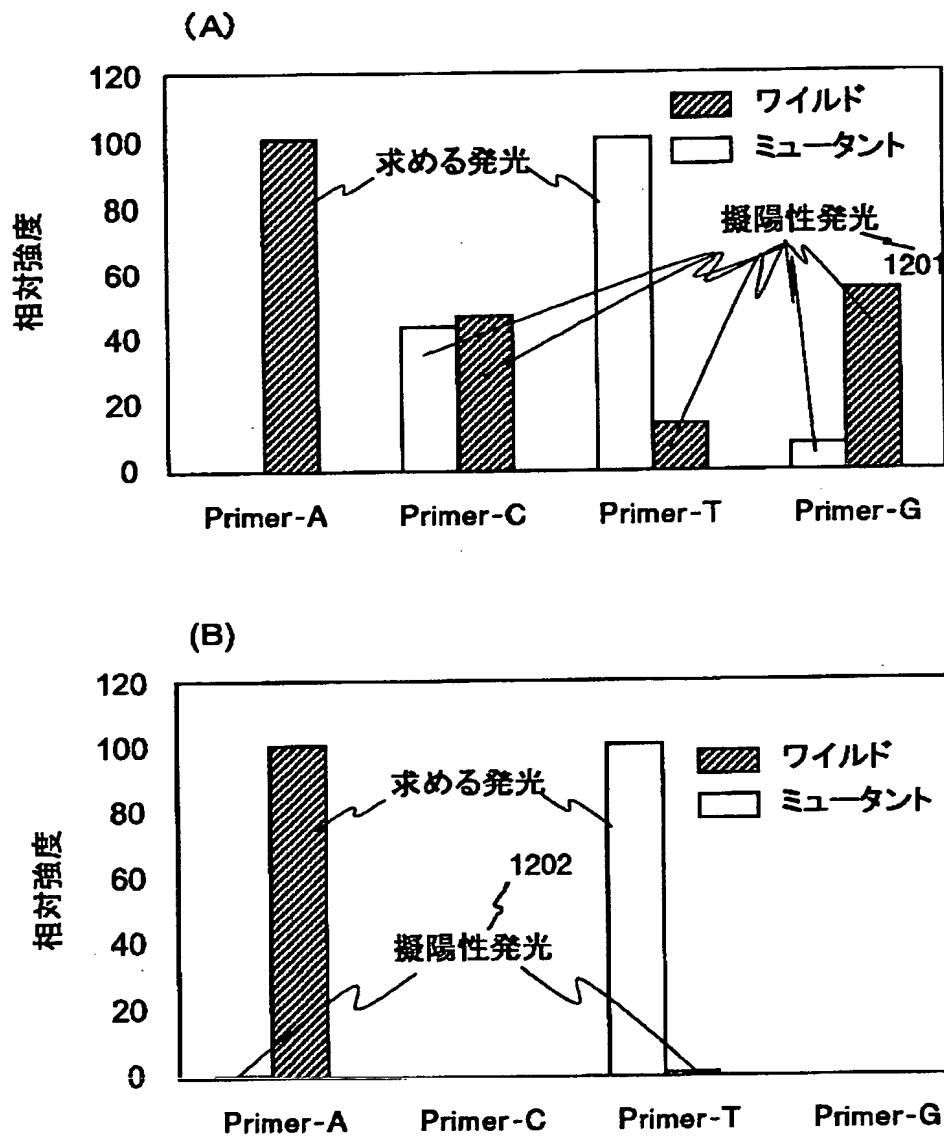


【図 12】



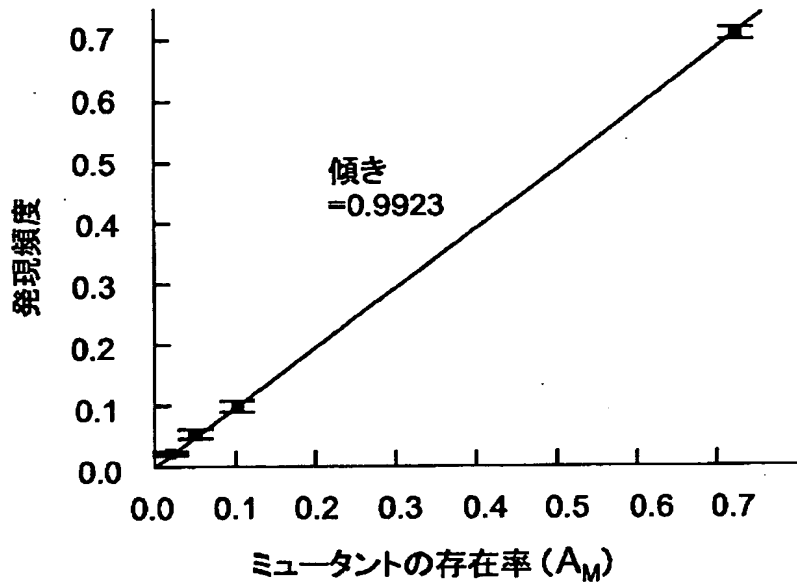
【図 13】

図 13

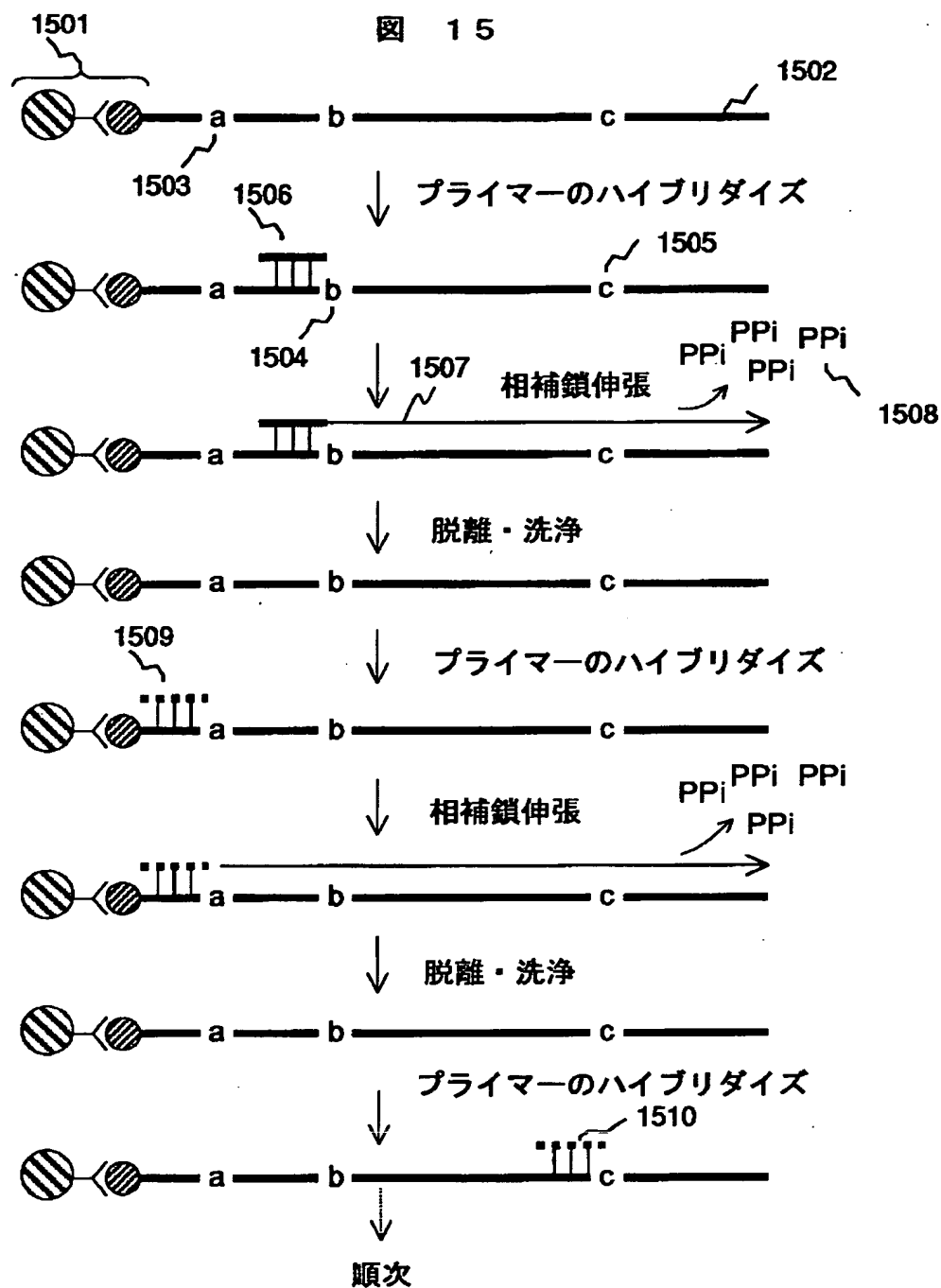


【図 14】

図 14

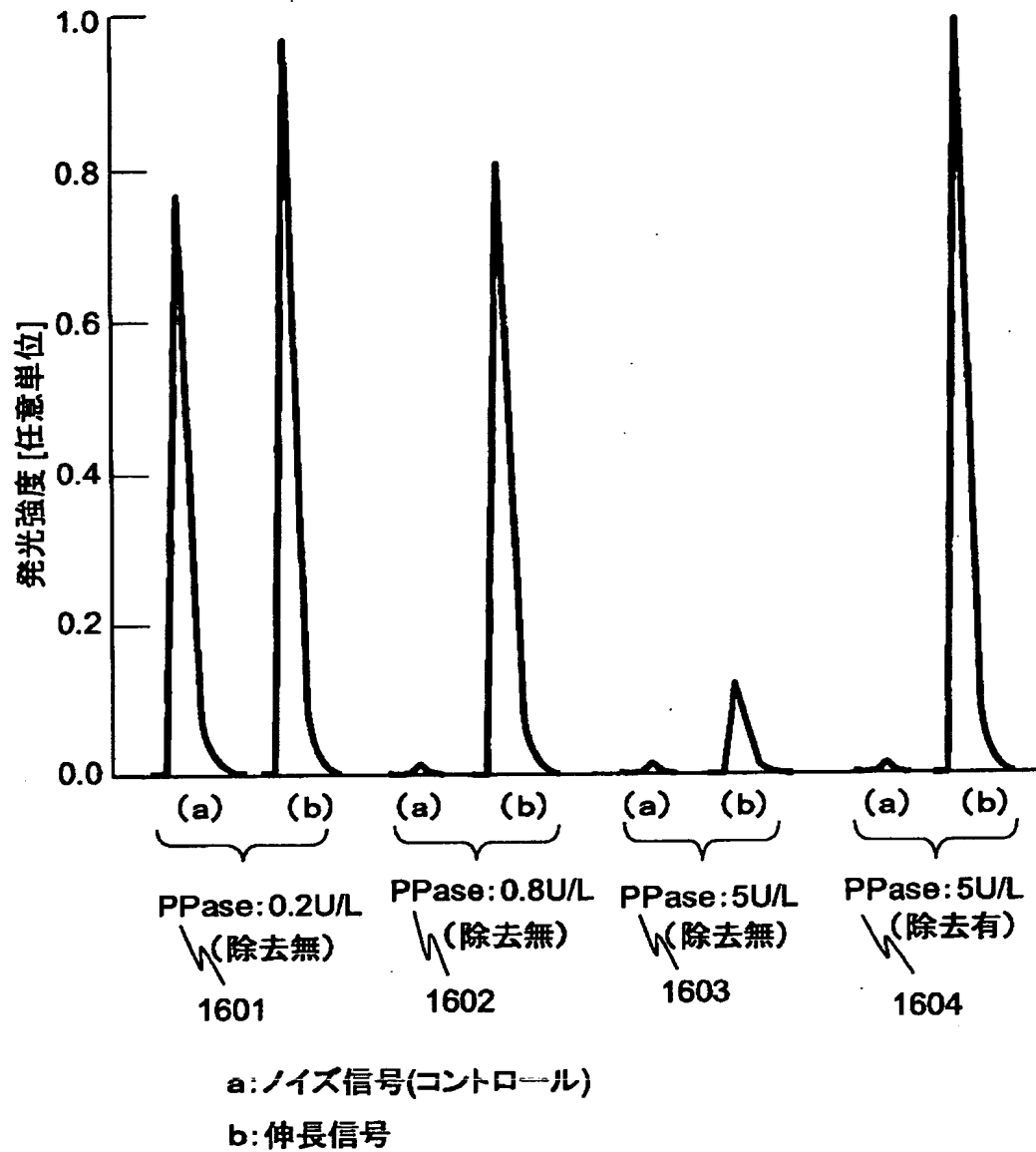


【図15】



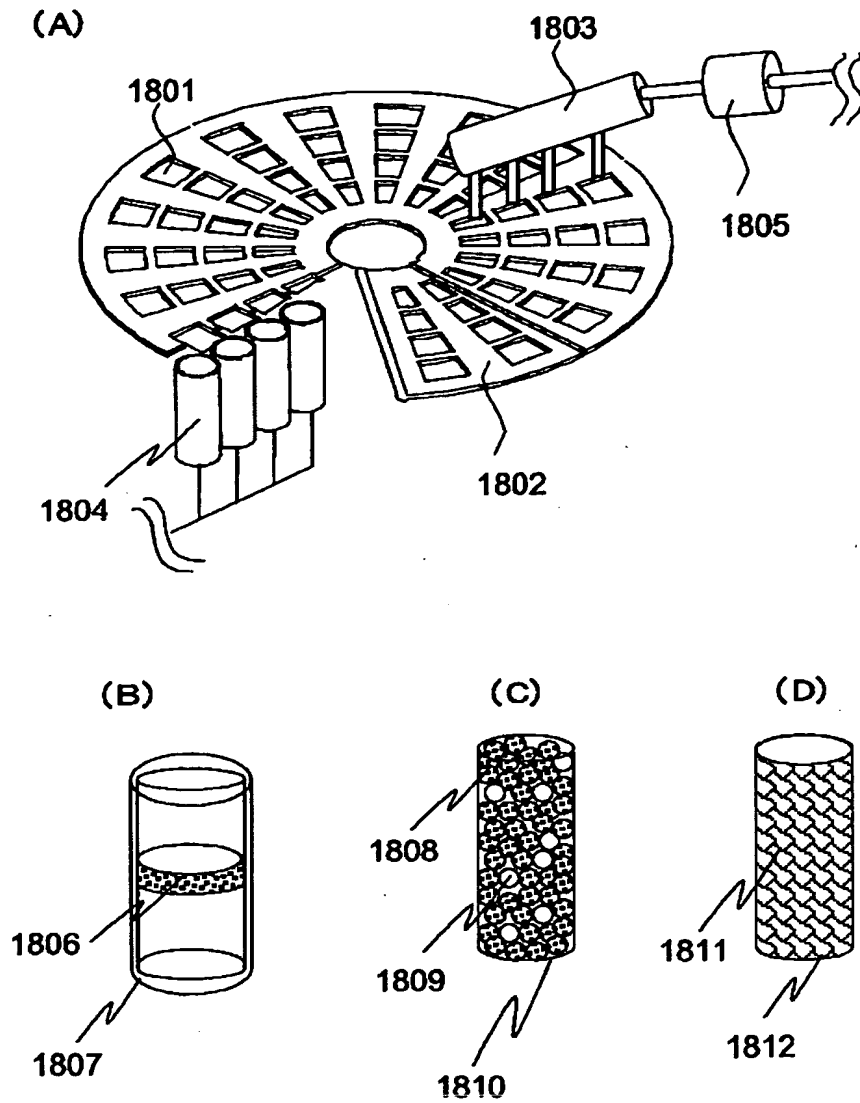
【図 16】

図 16



【図 17】

図 17



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNAの塩基変異（SNPs）を検出する核酸塩基配列解析法および試薬キットおよび核酸塩基配列解析装置を提供する。

【解決手段】 相補鎖伸長反応および化学発光反応に使用する各試薬を、ピロフォスファターゼ、Apyraseにより前処理する。化学発光反応を妨害する不純物のPPiをピロフォスファターゼで分解し、不純物のATPをApyraseで分解する。前処理された試薬を使用して相補鎖伸長反応および化学発光反応を行う。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日 1990年 8月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名 株式会社日立製作所